用于增强免疫响应的复合物的制备方法

相关申请的交叉引用

本申请要求于 2018 年 06 月 29 日提交中国专利局的申请号为 201810698033.6、名称为“用于增强免疫响应的复合物的制备方法”的中国专利申请,以及于 2018 年 06 月 29 日提交中国专利局的申请号为 201810700708.6、名称为“用于增强免疫响应的复合物”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本公开涉及生物医药领域，具体而言，涉及一种用于增强免疫响应的复合物的制备方法。

背景技术

双链 RNA（dsRNA）佐剂目前一般认为包括 PIC（polyriboinosinic-polyribocytoidylic acid）、PICLC（PIC with poly-L-lysine and carboxymethylcellulose）、$PIC_{12}U$（PIC with uridylic acid in specific interval，商品名 Ampligen）和 PICKCa（(PIC-kanamycin-$CaCl_2$），是多种膜式识别受体（PRRs）的配体，一方面增强免疫反应，另一方面通过改变免疫类型，有可能使预防性疫苗成为治疗性疫苗。

PIC（聚肌胞）是上世纪 60 年代由美国默克公司研制的。在小白鼠中，PIC 是 IFN-α 诱生剂，有抗病毒活性。PIC 可以保护小白鼠鼻腔和肺部致死性的感染。然而由于灵长类动物和人血清核酸酶对 PIC 的降解，减低 PIC 结构的稳定性，只产生很少 IFN-α，也不具有抗肿瘤活性。

PICLC（聚肌胞+赖氨酸+羧甲基纤维素）是 Levy HB 等上世纪 70 年代研制的，即 PIC 与聚赖氨酸(PolyL-lysine，相对分子质量 27 000）和羧甲基纤维素（CMC，相对分子质量 700 000）的结合物，使相对分子质量增大了许多，较 PIC 能 5-10 倍抵抗灵长目动物核酸酶水解，并在猴体内产生显著的干扰素（15）。PICLC 初步的临床研究表明治疗剂量就引起中到重度反应，发烧（100%），肌痛（50%），低血压（50%），白细胞明显下降等。这造成分子量大毒性大的认识误区。

$PIC_{12}U$ 是上世纪 70 年代中期在美国约翰霍普金斯大学研制的，是在 PIC 链一定位置插入尿嘧啶核苷酸。效力类似 PIC，但毒性较少。2012 年 8 月 Hemispherx 生物药品公司呈送了进一步原始的临床研究资料，但还是以安全性和有效性资料不足没有被美国食品药品管理局（FDA）批准。

PICKCa 含有抗生素卡那霉素，卡那霉素具有中有耳毒性，并且在疫苗中含量超过国家药典规定的标准。

可见，单纯 PIC 不能用于灵长类以上动物包括人， $PIC_{12}U$ 则因为效果差没有被美国 FDA 批准，而 PICLC 实际上也具有很强的副作用。

有鉴于此，特提出本公开。

发明内容

本公开涉及一种新颖的复合物，并对该复合物的制备、应用等方面进行研究。

在发明人之前的工作中，采用 PIC、卡那霉素、氯化钙配制疫苗佐剂（商品名叫皮卡佐剂或 PIKA 佐剂）。使用卡那霉素是缘于其含有 4 个氨基与 PIC 中磷酸基结合稳定其结构，但该商品却因含有抗生素而限制了在疫苗中的应用。

进一步的，发明人发现使用壳聚糖（盐酸盐）替换卡那霉素也同样可以起到阳离子稳定剂的作用，然而壳聚糖（盐酸盐）分子量大，不易被人体所吸收，因而难以获得理想的药效。

因此，本公开提供一种用于增强免疫响应的复合物。该复合物至少由以下成分在适宜条件下制备得到：聚肌胞、至少一种阳离子稳定剂以及可溶性钙盐。

该复合物至少由以下成分在适宜条件下制备得到：聚肌胞、至少一种阳离子稳定剂以及可溶性钙盐或/及锰盐。

其中，所述阳离子稳定剂为分子量≤5kDa 的水溶性非抗生素氨基化合物，或所述水溶性非抗生素氨基化合物与聚乙二醇单甲醚、聚乙二醇、聚乙烯亚胺、叶酸、半乳糖中的一种或多种所形成的接枝物。

与现有技术相比，该复合物黏度和分子质量适中，制药方便，化学性质稳定，长期储存不易降解，使用安全，该化合物单独使用即可显著地增强机体非特异性的免疫反应，达到防治疾病的目的，与其他药物联合使用具有更好的抗肿瘤、抗病毒和抗（超级）细菌功效，易被患者所吸收。

附图说明

为了更清楚地说明本公开具体实施方式或现有技术中的技术方案，下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图是本公开的一些实施方式，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 为帕米卡复合物结构示意图；A：PolyI:C-COS-Ca^{2+}的复合物结构示意图；B：抗原（Ag）+复合物粒子的结构示意图；C：PolyI:C-COS-Ca^{2+}+Ag 的复合物结构示意图；

图 2 为 PIC 加热不同时间后的分子量电泳图；

图 3 为本公开一个实施例中帕米卡复合物的酶降解曲线；

图 4 为本公开一个实施例中帕米卡复合物的融化曲线；

图 5 为本公开一个实施例中在 240-260nm 处各物质的扫描吸收光谱；

图 6 为本公开一个实施例中 PIC-COS-$CaCl_2$ 复合物的透射电镜图；scale bar = 500nm；

图 7 为本公开一个实施例中 PIC-COS-$CaCl_2$ 复合物的透射电镜图；scale bar = 200nm；

图 8 为本公开一个实施例中 PIC-COS-g-MPEG-$CaCl_2$ 复合物的透射电镜图；scale bar = 200nm；

图 9 为本公开一个实施例中 PIC-COS-g-MPEG-$CaCl_2$ 复合物的透射电镜图；scale bar = 100nm；

图 10 为本公开一个实施例中 PIC-COS-$CaCl_2$ 复合物与 TPP 形成的纳米粒子的透射电镜图；scale bar = 1000nm；

图 11 为本公开一个实施例中 PIC-COS-$CaCl_2$ 复合物与 TPP 形成的纳米粒子的透射电镜图；scale bar = 200nm；

图 12 为本公开一个实施例中分别用铝佐剂/rHBsAg(CHO)、ADV20/rHBsAg(CHO)、帕米卡/rHBsAg(CHO) 免疫小白鼠 21 天后，Elisa 法检测小鼠血清中 IgG 抗体检测图；

图 13 为本公开一个实施例中分别用铝佐剂/rHBsAg(CHO)、ADV20/rHBsAg(CHO)、帕米卡/rHBsAg(CHO) 免疫小白鼠 21 天后的体液免疫情况；纵坐标为脚垫肿胀：增加的毫米数（footpad swealling：mm increase）；

图 14 为本公开一个实施例中帕米卡复合物与完全弗氏佐剂在 MYO 抗原对应抗体制备中的效果比较；

图 15 为本公开一个实施例中帕米卡复合物与完全弗氏佐剂在 MYO 抗原对应抗体制备中的效果比较；

图 16 为本公开一个实施例中帕米卡组刺激巨噬细胞吞噬功能的实验示例图片；

图 17 为本公开一个实施例中 PBS 对照组无刺激巨噬细胞吞噬功能的实验示例图片；

图 18~21 为本公开一个实施例中帕米卡粘膜免疫制剂对荷瘤小白鼠 LL2 肺癌模型的抗癌作用实验结果；

图 18：不同药物处理下肿瘤体积变化曲线；

图 19：不同药物处理下肿瘤重量（给药后 14 天溶媒对照组的肿瘤体积达到 2201.09 ± 68.01mm3，在给药后的第 14 天结束实验）；

图 20：A：溶媒对照，滴鼻，两天一次；B：顺铂(5mg/kg)，尾静脉注射，一周一次；C：Pamica-1（即帕米卡），200 μg/鼠，滴鼻，两天一次；D：Pamica-1，200 μg/鼠，滴鼻（接种后随即给药），两天一次；E：Pamica-1，150 μg/鼠，滴鼻，两天一次；F：Pamica-1，200 μg/鼠，肌肉注射，两天一次；G：Pamica-1+顺铂，200 μg/鼠+5mg/kg，滴鼻+尾静脉注射，两天一次+一周一次；scale bar = 1cm；

图 21：鼠源性的 PD-1 抗体的抑瘤率；

图 22~35 为本公开一个实施例中帕米卡对 4T1-luc 小鼠原位乳腺癌模型的体内抗肿瘤效果；

图 22：肿瘤体积变化曲线；

图 23：小鼠体重变化曲线；

图 24：不同药物处理对瘤重的影响；
图 25：不同药物影响下的肿瘤照片；
图 26：不同药物处理对脾重的影响；
图 27：不同药物影响下的肺脏正面照片；
图 28：不同药物影响下的肺脏反面照片；
图 29~35：小动物成像仪显示的瘤部位和转移灶生物发光强度的照片；
图 29：帕米卡提前 7 天组小鼠生物发光；
图 30：帕米卡第 0 天组小鼠生物发光；
图 31：溶媒组小鼠生物发光；
图 32： 200 μg/只帕米卡滴鼻组小鼠生物发光；
图 33：300 μg/只帕米卡滴鼻组小鼠生物发光；
图 34：200 μg/只帕米卡肌注组小鼠生物发光；
图 35：300 μg/只帕米卡肌注组小鼠生物发光。

具体实施方式

本公开可通过后续对于本公开一些实施方案描述以及其中所包括的实施例的详细内容而更容易被了解。

在进一步叙述本公开之前，应明了本公开不会被局限于所述特定实施方案中，因为这些实施方案必然是多样的。亦应明了本说明书中所使用的用语仅是为了阐述特定实施方案，而非作为限制，因为本公开的范围将会被仅仅界定在所附的权利要求中。

名词定义

在陈述本公开的详细内容之前，应当了解被使用于本说明书中的数个用语。

“帕米卡”此用语是一般性地指称由聚肌胞、阳离子稳定剂以及可溶性钙盐（钙离子）制备得到的复合物，而和该复合物的特定物理和免疫原性无关。

“聚肌胞”亦称聚肌胞苷酸、聚肌苷酸聚胞苷酸、聚肌苷酸胞嘧啶核苷酸、聚肌苷酸-聚胞苷酸、PIC 或 PolyI:C。

本说明书中所使用的“增强免疫响应”此用语是指诱导或增强宿主对抗原物质的免疫反应，或者增强免疫细胞的功能，或促进免疫细胞释放炎症因子或细胞因子，或提高宿主对致病物质的抵抗力。

“诱导免疫反应”此用语是指刺激、起始或诱导一个免疫反应。

“增强(potentiating)免疫反应”是指一个既存的免疫反应被改善、助长、补充、扩增、促进、增加或延长。

“增强免疫反应”此表达方式或类似表达方式的意思是，相较于先前的免疫反应状态，免疫反应被提高、改善或上升，而对宿主有利，所述先前的免疫反应状态例如给予本公开的免疫原组合物之前的免疫反应状态。

“个体”此用语在此和“宿主”、“主体”和“动物”互换使用，包括人类及所有畜养(如家畜和宠物)和野生的动物及禽鸟，其非限制性地包括牛、马、乳牛、猪、绵羊、山羊、大鼠、小鼠、狗、猫、兔、骆驼、驴、鹿、貂、鸡、鸭、鹅、火鸡、斗鸡等。

“抗体”此用语包括多克隆抗体及单克隆抗体以及这些抗体的抗原化合物结合片段，包括 Fab、$F(ab')_2$、Fd、Fv、scFv、双特异抗体和抗体最小识别单位，以及这些抗体和片段的单链衍生物。抗体的类型可以选择 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD。此外，“抗体”此用语包括天然发生的抗体以及非天然发生的抗体，包括例如嵌合型(chimeric)、双功能型(bifunctional)和人源化(humanized)抗体，以及相关的合成异构形式(isoforms)。“抗体”此用语可和“免疫球蛋白”互换使用。

如本说明书中所使用，“抗原化合物”此用语是指可在适当情形下被免疫系统所辨识(例如结合至抗体或被加工，以诱导细胞免疫反应)的任何物质。

如本说明书中所使用，“抗原”包括但不限于细胞、细胞提取物、蛋白质、脂蛋白、糖蛋白、核蛋

白、多肽、肽、多糖、多糖缀合物、多糖的肽仿真体、脂肪、糖脂质、糖类、病毒、病毒提取物、细菌、细菌提取物、真菌、真菌提取物、多细胞生物例如寄生虫、以及过敏原。抗原可为外源性(例如来自于被给予该抗原的个体以外的其它来源，例如来自于一个不同的物种)或是内源性(例如源自于宿主体内，例如身体的疾病因子、癌抗原、病毒感染细胞所产生的抗原等等)。抗原可以是天然型(例如天然产生的)、合成型或重组型。抗原包含细胞提取物、完整细胞和纯化抗原，其中“纯化”此用语是指该抗原呈现相较于抗原通常存在的环境和/或相较于粗提物(例如抗原的培养形式)更为丰富的形式。

本说明书中所使用的“疫苗组合物”此用语是指由二或更多种物质(例如抗原和佐剂)所构成的组合，当将这些物质给予宿主时会共同激发免疫反应。

“多肽”、“肽”“寡肽”和“蛋白”等用语在本说明书中可互换使用，它们的意思是任何长度氨基酸聚合物形式，该聚合物形式可包括编码和非编码性氨基酸、经化学或生化修饰或衍生的氨基酸以及具有修饰肽主链的多肽。

“免疫反应”此用语是指脊椎动物个体的免疫系统对于抗原性或免疫原性化合物的任何反应。典型的免疫反应包括但不限于局部及系统性细胞及体液免疫反应，例如包括 CD8+CTLs 的抗原特异性诱导作用在内的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应、包括 T-细胞增殖反应和细胞因子释出作用在内的辅助 T-细胞反应，以及包括抗体反应在内的 B-细胞免疫反应。

使用于此处的“佐剂”此用语是指增加或改变宿主对于抗原化合物的免疫反应的任何物质或物质混合物。

本说明书中所使用的“治疗”此用语是一般性地指称获得所需药理和/或生理效应。该效应从完全地和/或部分地防止疾病或其症状的角度来看可以是属于预防性质的，和/或该效应从完全地和/或部分地稳定或治愈疾病和/或疾病所导致的负面效果来看可以是属于医疗性质的。本说明书中所使用的“治疗”此用语涵盖对于个体(特别是哺乳动物个体，更特别是人类)体内的疾病的任何处理，且包括：(a)预防可能有罹病倾向但尚未诊断出罹病的个体发生疾病或症状；(b)遏制疾病症状，例如阻止该疾病症状的发展；或是舒缓疾病症状，例如致使该疾病或症状消退；(c)降低疾病传染物质所产生的产物水平(例如毒素、抗原等)；(d)降低对于疾病传染物质的不利生理反应(例如发烧、组织水肿等)。

“药学上可接受的盐”的化学物意指该盐是药用上可接受的，且拥有母化合物的所需药理活性。这些盐包括：(1)合成盐的酸，例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等无机酸共同形成盐；或是和例如乙酸、丙酸、己酸、环戊丙酸、羟乙酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯酰基)苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1，2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟脑磺酸、葡庚糖酸、4，4′-亚甲基双-(3-羟基-2-烯-1-羧酸)、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、三级丁基乳酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟基萘甲酸、水杨酸、硬脂酸、粘康酸等有机酸等共同形成盐；或是(2)当母化合物中所存在的酸性质子被如碱金族金属离子、碱土族金属离子或铝离子等金属离子所置换，或是配位有如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨基丁三醇(tromethamine)、甲基葡萄糖胺(N-methylglucamine)等有机碱时，所形成的盐。

本公开的示例性实施方案

本公开一方面涉及一种用于增强免疫响应的组合产品，其包括聚肌胞、至少一种阳离子稳定剂以及可溶性钙盐；

所述阳离子稳定剂为分子量≤5kDa 的水溶性非抗生素氨基化合物，或所述水溶性非抗生素氨基化合物与聚乙二醇单甲醚、聚乙二醇、聚乙烯亚胺、叶酸、半乳糖中的一种或多种所形成的接枝物。

一个重要优点在于帕米卡单独使用即可增强机体非特异免疫反应，更可有效地引起特异体液免疫反应和细胞免疫反应，从而增进保护性免疫力；和抗原物质联合使用可达到更佳的效果。

一个重要优点在于帕米卡能通过《中国药典》2015 版四部“1141 异常毒性的检查法”，能够安全应用于人体。未加热处理分子量的 PIC 配制的复合物（如皮氨钙佐剂或皮氨钙佐剂疫苗）不能通过异常毒性的检测。

一个重要优点在于帕米卡具有更佳的化学和/或物理稳定性，从而更便于保存。

一个重要优点在于帕米卡可以通过信号传导通路促进肿瘤细胞凋亡，也可以刺激免疫细胞表达多种

细胞因子并改变肿瘤细胞微环境，让免疫细胞攻击肿瘤细胞、病毒、细菌等病原物质。

一个重要优点在于帕米卡更易于被宿主所吸收，或被宿主细胞所吞噬。进而还可以把抗原更多地带入到细胞中，从而增强蛋白和多肽引起的免疫响应。

一个重要优点在于帕米卡对癌痛患者止疼效果明显。

一个重要优点在于帕米卡可以使 HPV 感染者的病毒滴度从强阳性转为阴性。

一个重要优点在于帕米卡+布氏杆菌灭活疫苗保护效果很好。

需要注意的是，帕米卡并非简单的组合物，通过本公开说明书所述，其是一种全新结构的复合物。

在一些实施方式中，所述阳离子稳定剂的分子量还可以选择 4kDa、4.5kDa、3kDa、3.5kDa、2.5kDa、2kDa、1.5kDa、1kDa、500Da、400Da、300Da、200Da、100Da。

在一些实施方式中，所述水溶性非抗生素氨基化合物选自壳寡糖、几丁寡糖、氨基葡萄糖、阳离子脂质体、DEAE-葡聚糖、聚丙烯酰胺、聚胺、四氨富烯、聚乙烯亚胺中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述阳离子稳定剂选自壳寡糖和聚乙二醇单甲醚的接枝物（COS-g-MPEG）、壳聚糖盐酸盐与聚乙二醇的接枝物（PEG-g-CS）、叶酸和壳聚糖盐酸盐的接枝物（FA-g-CS）、半乳糖和聚乙二醇和聚乙烯亚胺的接枝物（GAL-g-PEG-g-PEI）、壳寡糖和聚乙二醇单甲醚和聚乙烯亚胺的接枝物（COS-g-MPEG-g-PEI）、壳聚糖和聚乙二醇单甲醚和聚乙烯亚胺的接枝物（CS-g-PEG-g-PEI）、聚乙二醇和聚乙烯亚胺的接枝物（PEI-g-PEG）、壳寡糖和聚乙烯亚胺的接枝物（PEI-g-COS）、壳聚糖盐酸盐和聚乙烯亚胺的接枝物（PEI-g-CS）、壳寡糖和聚乙二醇的接枝物（COS-g-PEG）、壳寡糖和聚乙二醇和聚乙烯亚胺的接枝物（COS-g-PEG-g-PEI）。

在一些实施方式中，所述阳离子稳定剂选自壳寡糖（COS）、壳寡糖与聚乙二醇单甲醚的接枝物（COS-g-MPEG）、壳寡糖与聚乙二醇单甲醚和聚乙烯亚胺的接枝物（COS-g-MPEG-g-PEI）。

在一些实施方式中，所述接枝物的分子量≤50kDa。

在一些实施方式中，所述接枝物的分子量还可以选择 45kDa、40kDa、35kDa、30kDa、25kDa、20kDa、15kDa、10kDa、9kDa、8kDa、7kDa、8kDa、5kDa、4kDa、3kDa、2kDa、1kDa、500Da、400Da、300Da、200Da、100Da。

在一些实施方式中，所述壳寡糖脱乙酰度≥70%；还可以选择 80%，85%，90%或 95%；优选 90%~100%。

在一些实施方式中，壳寡糖单体分子量为 161，聚合度为 2-20，选用分子量范围为 322-3220。

在一些实施方式中，壳寡糖、几丁寡糖、氨基葡萄糖的分子量≤3200。

在一些实施方式中，聚乙二醇单甲醚、聚乙二醇、聚乙烯亚胺的分子量为≤40000，也可以选择 30000，20000，15000，10000，8000，6000，4000，2000，1500，1000 或 500。

在一些实施方式中，所述可溶性钙盐选自 $CaCl_2$ 和/或 $CaNO_3$。

在一些实施方式中，所述聚肌胞的分子量为 100bp-3000bp。

在一些实施方式中，所述聚肌胞的分子量为 100bp-1500bp。

在一些实施方式中，所述的组合产品还包括 pH 调节剂、三聚磷酸钠、海藻酸钠、苯基硼酸、苯邻二酚、缓冲盐/试剂以及水中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述组合产品中的各成分单独包装；

在一些实施方式中，所述组合产品中的至少两种成分混合包装在一起，例如将正价离子与水和/或缓冲盐包装在一起；

在一些实施方式中，聚肌胞以其原料的形式进行包装，例如肌苷酸（PI）与胞苷酸（PC）。

根据本公开的一方面，本公开还涉及一种用于增强免疫响应的复合物，其由如上所述的组合产品中的试剂制备得到。

在一些实施方式中，所述制备在溶液体系中进行，且在所述试剂中，所述聚肌胞的浓度为 0.1~10mg/ml；

聚肌胞的浓度可通过接枝的方式提升溶解度，理论上可达到更高浓度；

在一些实施方式中，所述制备在溶液体系中进行，且在所述试剂中，所述聚肌胞的浓度为 0.5~5mg /ml，还可以选择 1mg /ml、2mg /ml、3mg /ml、4mg /ml、5mg /ml、6mg /ml、6.4mg /ml、7mg /ml、8mg /ml 或 9mg /ml。

在一些实施方式中，所述制备在溶液体系中进行，且在所述试剂中，所述阳离子稳定剂的浓度为0.5~51.2mg/ml；

在一些实施方式中，所述阳离子稳定剂的浓度为 0.8~25.6mg/ml，还可以选择 1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml 或 20mg/ml。

在一些实施方式中，所述制备在溶液体系中进行，且在所述试剂中，所述聚肌胞与所述阳离子稳定剂的质量比为 1：0.8~25.6；还可以选择 1：6.4 或 1：12.8。

在一些实施方式中，所述制备在溶液体系中进行，且在所述试剂中，所述可溶性钙盐中钙离子的浓度为 0.1~1mM，还可以选择 0.2mM、0.3mM、0.4mM、0.5mM、0.6mM、0.7mM、0.8mM 或 0.9mM。

在一些实施方式中，所述的复合物保存于溶液中。

所述溶液优选为缓冲溶液。

在一些实施方式中，所述溶液的 pH=5.0~7.2。

在一些实施方式中，所述溶液的 pH=5.9~6.9，还可以选择 6.0、6.2、6.4、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6 或 7.8。

根据本公开的一方面，本公开还涉及如上所述的复合物作为免疫佐剂的非治疗用途。

根据本公开的一方面，本公开还涉及如上所述的复合物用于制备抗体、疫苗制剂或疫苗组合物的用途，或用于制备疫苗辅料或疫苗佐剂的用途。

根据本公开的一方面，本公开还涉及一种疫苗组合物，其含有如上所述的复合物以及至少一种抗原。

在一些实施方式中，所述抗原为病毒、细菌、蛋白、多肽、多糖、核酸或小分子-蛋白偶合物。

在一些实施方式中，所述的疫苗组合物例如为减毒疫苗(例如为病毒或细菌的减毒疫苗)、灭活疫苗(例如为病毒或细菌的灭活疫苗)、蛋白疫苗、多糖疫苗、蛋白质亚单位疫苗、嵌合载体疫苗、DNA 疫苗、RNA 疫苗、多肽疫苗或小分子-蛋白偶合物疫苗。

根据本公开的一方面，本公开还涉及如上所述的复合物在调节免疫细胞活性中的应用，所述应用于体内或体外进行。

在一些实施方式中，所述调节免疫细胞活性具体为增强免疫细胞活性。

在一些实施方式中，所述免疫细胞选自巨噬细胞、淋巴细胞和树突细胞。

在一些实施方式中，所述调节增强免疫细胞活性为促进所述免疫细胞释放炎症因子。

在一些实施方式中，所述炎症因子包括 IL-2、IL-6、IL-12p40、IL-18、IL-22、IFN-α、IFN-γ 以及 TNF-α。

在一些实施方式中，所述炎症因子包括 IFN-γ 以及 TNF-α。

根据本公开的一方面，本公开还涉及如上所述的复合物在制备用于治疗和/预防肿瘤、抗病毒、抗细菌、抗真菌、抗寄生虫、降低化疗副作用、抗疲劳或提升免疫力、缓解宿主疼痛、促进宿主对于抗原的免疫反应的药物中的应用。

在一些实施方式中，所述药物为注射给药剂型、呼吸道给药剂型、滴鼻剂、皮肤给药剂型、黏膜给药剂型或腔道给药剂型。

在一些实施方式中，注射给药剂型选自：如注射剂（包括静脉注射、肌内注射、皮下注射、皮内注射多种注射途径）。

在一些实施方式中，呼吸道给药剂型选自：如喷雾剂、气雾剂、粉雾剂等。

在一些实施方式中，皮肤给药剂型选自：如外用溶液剂、洗剂、搽剂、软膏剂、硬膏剂、糊剂、贴剂等，给药后在局部起作用或经皮吸收发挥全身作用。

在一些实施方式中，黏膜给药剂型选自：如滴眼剂、滴鼻剂、眼用软膏剂、含漱剂、舌下片剂等，黏膜给药可起局部作用或经黏膜吸收发挥全身作用。⑤腔道给药剂型：如栓剂、气雾剂等，用于直肠、阴道、尿道、鼻腔、耳道等，腔道给药可起局部作用或吸收后发挥全身作用。

在一些实施方式中，所述抗原包括肿瘤、病毒、细菌、真菌或寄生虫抗原。

在一些实施方式中，所述宿主为哺乳动物。

在一些实施方式中，所述宿主为灵长类动物。

在一些实施方式中，所述宿主为人类。

在一些实施方式中，当所述抗原为病毒、细菌、真菌或寄生虫抗原时，所述药物每剂含药量为1~8mg；

在一些实施方式中，当所述抗原为肿瘤抗原时，所述药物每剂含药量为1~10mg。

根据本公开的一方面，本公开还涉及一种药物组合物，所述药物组合物包含如上所述的复合物，所述药物组合物还包括免疫细胞治疗药物、抗体治疗药物、化学药物、促进粘膜免疫吸收或粘膜粘附的物质、免疫调节剂、病原体抗原、膜式识别受体的配体、药物可接受的赋形剂中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述免疫细胞治疗药物选自肿瘤浸润淋巴细胞（tumor infiltrating lymphocyte, TIL)、树突状细胞（dendritic cells, DC)、细胞因子诱导杀伤细胞（cytokine induced killer, CIK)、树突细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞（DC-CIK)、自然杀伤细胞(natural killer cell，NK)、γδT细胞、CD3AK、CAR-T和TCR-T中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述抗体治疗药物选自抗PD1抗体、抗PDL1抗体、抗CTLA4抗体和抗CD抗原抗体。

在一些实施方式中，所述化学药物选自烷化剂、抗代谢药、抗肿瘤抗生素、植物类抗肿瘤药、激素类药物和杂类药物中的一种或多种；

其中所述杂类药物选自左旋门冬酰胺酶、顺铂、卡铂、草酸铂、氮烯咪胺、六甲嘧胺类药物，或上述药物的衍生物。

在一些实施方式中，所述烷化剂选自环磷酰胺、白消安、弹烯咪胺、顺氯氨铂、二氯甲二乙胺、苯丙氨酸氮芥、亚硝脲类和上述药物的衍生物；

在一些实施方式中，所述抗代谢药选自5-氟脲嘧啶、家氨蝶呤、阿糖胞苷、环胞苷、羟基脲和上述药物的衍生物；

在一些实施方式中，所述抗肿瘤抗生素选自放线菌素、丝裂霉素、黄胆素、阿霉素、红必霉素、更生霉素、博来霉素和上述药物的衍生物；

在一些实施方式中，所述激素类药物选自性激素、皮质类固醇激素和上述药物的衍生物。

在一些实施方式中，所述促进粘膜免疫吸收或粘膜粘附的物质选自阴离子表面活性剂（如羧酸盐类、磺酸盐类、硫酸酯类、磷酸酯类等)、阳离子表面活性剂（如胺盐类、季铵盐类、杂环类、鎓盐类等)、两性离子表面活性剂如羧酸盐型、磺酸盐型、磷酸酯型、甜菜碱型、咪唑啉型、氨基酸型等)、非离子表面活性剂（如烷基多苷型、聚氧乙烯型、多元醇型、烷醇酰胺型、嵌段聚醚型)、特种表面活性剂（如含氟型、含硅型、含硼型、高分子型等)、螯合剂（如多磷酸盐、氨基羧酸、1,3-二酮，羟基羧酸、多胺等)、粘合剂【水溶型粘合剂（如淀粉、糊精、聚乙烯醇、羧甲基纤维素等)、热熔型粘合剂（如聚氨酯、聚苯乙烯、聚丙烯酸酯、乙烯-醋酸乙烯共聚物等)、溶剂型粘合剂（如虫胶、丁基橡胶等)、乳液型粘合剂（如醋酸乙烯树脂、丙烯酸树脂、氯化橡胶等)、无溶剂液体粘合剂（如环氧树脂等)】、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、右旋糖酐、多聚糖中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述免疫调节剂选自细胞因子、趋化因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、造血因子、集落刺激因子(CSF)、干扰素、促红细胞生成素、促血小板生成素、肿瘤坏死因子（TNF)、白介素(IL)、粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)和干细胞生长因子中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述病原体抗原选自肿瘤、病毒、细菌、真菌或寄生虫抗原。

在一些实施方式中，所述肿瘤包括：骨、骨连接、肌肉、肺、气管、咽、鼻、心脏、脾脏、动脉、静脉、血液、毛细血管、淋巴结、淋巴管、淋巴液、口腔、咽、食管、胃、十二指肠、小肠、结肠、直肠、肛门、阑尾、肝、胆、胰腺、腮腺、舌下腺、泌尿肾、输尿管、膀胱、尿道、卵巢、输卵管、子宫、阴道、外阴部、阴囊、睾丸、输精管、阴茎、眼、耳、鼻、舌、皮肤、脑、脑干、延髓、瘠髓、脑瘠液、神经、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、垂体、松果体、胰岛、胸腺、性腺、舌下腺、腮腺中任一处病变生成的肿瘤。

在一些实施方式中，所述细菌包括：葡萄球菌属、链球菌属、李式杆菌属、丹毒丝菌属、肾杆菌属、芽孢杆菌属、梭菌属、分支杆菌属、放线菌属、奴卡菌属、棒状杆菌属、红球菌属、炭疽杆菌、丹毒杆菌、破伤风杆菌、李氏杆菌、产气荚莫杆菌、气肿疽杆菌结核杆菌、大肠杆菌外、变形杆菌、痢疾杆菌、肺炎杆菌、布氏杆菌、产气夹膜杆菌、流感嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌、卡他摩拉克氏菌、不动杆菌属、

耶尔森菌属、嗜肺军团菌、百日咳杆菌、副百日咳杆菌、志贺菌属、巴斯德菌属、霍乱弧菌、副溶血性杆菌中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述寄生虫包括：消化道内寄生虫（如蛔虫、钩虫、绦虫、溶组织内阿米巴和雅尔氏鞭毛虫等）、腔道内寄生虫（如阴道毛滴虫）、肝内寄生虫（如肝吸虫、棘球蚴）、肺内寄生虫（如卫斯特曼氏并殖吸虫）、脑组织寄生虫（如猪囊尾蚴、弓形虫）、血管内寄生虫（如血吸虫）、淋巴管内寄生虫（如丝虫）、肌肉组织寄生虫（如旋毛虫幼虫）、细胞内寄生虫（如疟原虫、利什曼氏原虫）、骨组织寄生虫（如包虫；皮肤寄生虫，如疥螨、毛囊螨）、眼内寄生虫（如吸吮线虫、猪囊虫）中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述病毒包括：腺病毒(adeniviridae)、沙粒病毒(arenaviridae)、星状病毒(astroviridae)、本扬病毒(bunyaviridae)、杯状病毒(cliciviridae)、黄病毒(flaviviridae)、D 型肝炎病毒(hepatitis delta virus)、肝炎病毒(hepeviridae)、单分子负链 RNA 病毒(mononegavirales)、巢病毒(nidovirales)、小 RNA 病毒(piconaviridae)、正黏液病毒(orthomyxoviridae)、乳头瘤病毒(papillomaviridae)、细小病毒(parvoviridae)、多瘤病毒(polyomaviridae)、痘病毒(poxviridae)、呼肠孤病毒(reoviridae)、反转录病毒(retroviridae)或披膜病毒(togaviridae)中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述病毒为人乳头瘤病毒（Human papillomavirus）。

在一些实施方式中，所述真菌包括：粗球孢子菌、普赛德斯球抱子菌、荚膜组织胞浆菌、杜氏组织胞浆菌、洛博芽生菌、巴西副球孢子菌、皮炎芽生菌、申克氏孢子丝菌、马尔尼菲青霉菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、葡萄牙假丝酵母、卡氏肺孢子虫病、曲霉菌、甄氏外瓶霉、裴氏着色霉、紧密着色霉、疣状着色霉、皮炎着色霉、白地霉、波氏足肿菌、新型隐球菌、丝孢酵母菌、米根霉、印度毛霉、伞枝犁头霉、总状共头霉、蛙粪霉、冠状耳霉、异孢耳霉、比氏肠胞微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、西伯鼻孢子菌、透明丝孢霉、暗色丝孢霉中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述膜式识别受体的配体选自 TLR 受体的配体、RLR 受体的配体、CLR 受体的配体、NLR 受体的配体。

在一些实施方式中，联合 TLR 受体的配体有：如肽聚糖、二聚糖、甘露聚糖、脂肽、糖脂、非典型脂多糖、血清淀粉样蛋白、CPG DNA、dsRNA、ssRNA、LPS、PGN、饱和脂肪酸、脂磷壁酸、抵抗素、乳铁蛋白、表面活性蛋白、透鞭毛蛋白、明质酸、RNA 相关抗原、Profilin 样分子等。

在一些实施方式中，联合 RLR 受体的配体有：如 RNA、PIC、PICLC、PIC12u 等。

在一些实施方式中，联合 CLR 受体的配体有：如真菌细胞壁表面的甘露糖和 β-葡聚糖等。

在一些实施方式中，联合 NLR 受体的配体有：如 MDP、Mes□ DAP 等。

根据本公开的一方面，本公开还涉及一种用于增强免疫响应的复合物的制备方法，包括：

将聚肌胞、至少一种阳离子稳定剂以及可溶性钙盐在液体反应体系中接触；

所述阳离子稳定剂为分子量≤5kDa 的水溶性非抗生素氨基化合物，或所述水溶性非抗生素氨基化合物与聚乙二醇单甲醚、聚乙二醇、聚乙烯亚胺、叶酸、半乳糖中的一种或多种所形成的接枝物。

在一些实施方式中，所述聚肌胞由聚胞苷酸和聚肌苷酸经碱基配对反应制得。

在一些实施方式中，所述聚胞苷酸、聚肌苷酸分子量大于 2.3 万道尔顿。

在一些实施方式中，所述聚胞苷酸的分子量范围是在 6.6 万道尔顿~66 万道尔顿。

在一些实施方式中，所述聚肌苷酸的分子量范围是在 6.6 万道尔顿~66 万道尔顿。

在一些实施方式中，所述碱基配对反应在 40℃~50℃的温度下进行，还可以选择 41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃或 49℃。

在一些实施方式中，所述碱基配对反应在 pH=6.8~7.6 下进行，还可以选择 7.0、7.2、7.4。

在一些实施方式中，在进行接触反应之前，将所述聚肌胞 80℃~99℃下加热 70~120min；

在一些实施方式中，温度还可以选择 82℃、84℃、86℃、88℃、90℃、92℃、94℃、96℃或 98℃；

在一些实施方式中，加热时间还可以选择 80min、90min、100min 或 110min。

在一些实施方式中，所述液体反应体系的温度为 40℃~50℃，还可以选择 41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃或 49℃。

在一些实施方式中，所述接枝物的制备方法包括：

先用羰基二咪唑活化聚乙二醇单甲醚、聚乙二醇、聚乙烯亚胺、叶酸、半乳糖中的一种或多种，再用活化好的产物与所述水溶性非抗生素氨基化合物在离子液体[bmim]Cl 中进行接枝反应。

在一些实施方式中，所述接枝物为壳寡糖与聚乙二醇单甲醚的接枝物，先用羰基二咪唑（CDI）活化聚乙二醇单甲醚（MPEG），再用活化好的 MPEG 与壳寡糖（COS）在离子液体[bmim]Cl 中进行接枝反应。

在一些实施方式中，所述接枝反应在 60℃~80℃、非氧化气氛下反应。

在一些实施方式中，所述方法还包括：

将交联剂溶液在搅拌条件下逐滴加入制得的复合物中直至观察到反应体系中出现丁达尔现象后停止滴加，搅拌得到纳米粒子；

所述交联剂选自三聚磷酸钠、海藻酸钠、苯基硼酸、苯邻二酚中的至少一种。

在一些实施方式中，所述交联剂溶液中含有（病原体）抗原。

在一些实施方式中，所述方法还包括，将所述复合物或所述纳米粒子与抗原共孵育。

在一些实施方式中，所述抗原为蛋白质或多肽抗原。

根据本公开的一方面，本公开还涉及一种用以促进宿主体内对于抗原的免疫反应，或调节增强宿主免疫细胞活性，或帮助宿主降低疲劳度，或减轻宿主疼痛的方法，该方法包含将如上所述的复合物，或如上所述的疫苗组合物，或如上所述的药物组合物给予该宿主。

在一些实施方式中，该宿主罹患传染病，且给予该抗原化合物激发免疫反应以对抗造成该传染病的病原体。

在一些实施方式中，所述给药通过胃肠道外注射、肌肉内注射、腹腔内注射、静脉注射、皮下注射、局部给药、透皮给药或皮内给药来进行。

在一些实施方式中，该宿主为手术化疗放疗或免疫疗法失败或医疗机构放弃治疗的肿瘤患者、病毒感染患者、细菌感染患者、寄生虫感染患者或鼻炎患者。

在一些实施方式中，所述方法可与手术、放疗、化疗以及各种免疫疗法联合使用，或与病毒感染患者、细菌感染患者、寄生虫感染患者也可以与传统疗法联合使用。

在一些实施方式中，所述疼痛为微生物或寄生虫感染引起的疼痛、癌症引起的疼痛患者或神经性引起的疼痛。

在一些实施方式中，当所述抗原为病毒、细菌、真菌或寄生虫抗原时，所述药物每次给药 1~8mg/kg；优选的，或每天或隔 1 天或 2 天或 3 天给药一次；

当所述抗原为肿瘤抗原时，所述药物每次给药 1~10mg/kg；优选的，给药周期或至少 360 天或至少 180 天或至少 60 天或至少 30 天。

本公开提供根据本公开所述方法制备的用于增强免疫响应的复合物。

本公开提供根据本公开所述方法制备的用于增强免疫响应的复合物，用于制备抗体、疫苗制剂或疫苗组合物，增强免疫细胞活性，治疗和/预防肿瘤、抗病毒、抗细菌、抗真菌、抗寄生虫、降低化疗副作用、抗疲劳或提升免疫力、缓解宿主疼痛、促进宿主对于抗原的免疫反应中的应用。

下面将结合实施例对本公开的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本公开，而不应视为限制本公开的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1 帕米卡的制备

一、帕米卡复合物的制备

1、配制 PBS 溶液（pH7.2）：

1.1 配制氯化钠溶液（0.85%，1500ml）：称量氯化钠 12.75g，放入 2000ml 量筒中，用注水定容至 1500ml；

1.2 配制磷酸氢二钠溶液（0.006mol/L，500ml）：称量磷酸氢二钠 0.006×0.5×141.96=0.4259g，放入 500ml 容量瓶中，用 0.85%生理盐水定容至 500ml；

1.3 配制磷酸二氢钠溶液（0.006mol/L，500ml）：称量磷酸二氢钠 0.006×0.5×137.99=0.4140g，放入 500ml 容量瓶中，用 0.85%生理盐水定容至 500ml；

1.4 配制 pH 值为 7.2 的 PBS 溶液：取 “1.2 液” 273.6ml + “1.3 液”126.4ml。

2、配制 PIC 液（2.0mg/ml，100ml）：

2.1 称取 PI 2.0mg/ml*100ml*【1.04/(1.04+1)】/91.5%/(1-2.7%)= 114.5mg，放入 250ml 三角瓶中，加 50ml PBS 溶液溶解，并用 40-60℃水浴平衡；

2.2 称取 PC 2.0mg/ml*100ml*【1/(1.04+1)】/90.4%/(1-4.2%)= 113.2 mg，放入 250ml 三角瓶中，加 50ml PBS 溶液溶解，并用 40-60℃水浴平衡；

2.3 配制 PIC 液：将 50ml PI 溶液倒入 50ml PC 溶液中，并在 45℃水浴反应 30 分钟。

2.4 80-99℃对 PIC 液进行分子量加热 15～300 分钟

3、配制氯化钙溶液（0.16mol/L，25ml）：

称取 $CaCl_2.2H_2O$（MW:147.02） 0.5881 g，放入 100ml 三角瓶中，加约 25ml 注射用水溶解并定容。

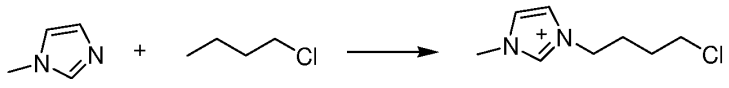
4、COS-g-MPEG 的制备：

其中 COS-g-MPEG 接枝物制备方法如下：制备壳寡糖接枝聚乙二醇单甲醚（COS-g-MPEG）接枝共聚物，以此为辅料制备抗癌药物。

原理：采用羰基二咪唑（CDI）偶联法制备 COS-g-MPEG。首先用羰基二咪唑活化聚乙二醇单甲醚（MPEG），制备活化的 MPEG，再用活化的 MPEG 与壳寡糖（COS）在离子液体中反应，合成 COS-g-MPEG 共聚物，具体反应步骤包括以下三步：

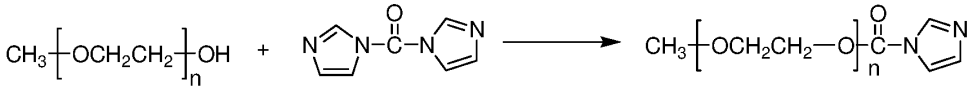
4.1 离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑氯盐（[BMIM]Cl）的制备

1-甲基咪唑和氯丁烷反应制备离子液体[BMIM]Cl，合成反应方程式如下：



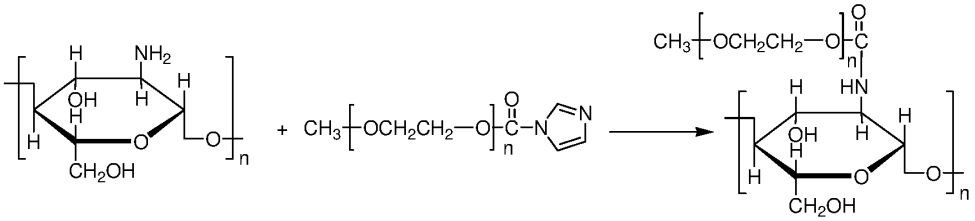
4.2 聚乙二醇单甲醚（MPEG，分子量 1000）的活化

用 CDI 活化 MPEG，合成反应方程式如下：



4.3 COS-g-MPEG 共聚物的合成；

活化的 MPEG 与 COS 在离子液体中进行接枝聚合，合成反应方程式如下：



4.4 器材试剂：

甲基咪唑、氯丁烷、甲苯、聚乙二醇单甲醚、羰基二咪唑、无水乙醚、4A 分子筛(2-3mm)、二甲基亚砜、1,4-二氧六环、壳寡糖、集热式恒温磁力加热搅拌器（DF-101S 型）、电子天平、电热鼓风干燥箱、循环水式真空泵、自动三重纯水蒸馏器、真空干燥箱、冷冻干燥机、玻璃仪器气流烘干器、单相电容起动电动机、旋片式真空泵、六联磁力加热搅拌器、纤维素透析袋、即用型透析袋 45-2000RC 膜、三口烧瓶（500mL、1000mL）、玻璃塞、磁子、一次性纸杯、500mL 烧杯、2L 烧杯、一次性滴管、药匙、试剂瓶、干燥器等。

4.5 准备：

4.5.1 蒸馏水的制备

用 SZ-97A 自动三重纯水蒸馏器制备三次蒸馏水。

4.5.2 玻璃器皿的清洗

将三口烧瓶、玻璃塞、培养皿、磁子等先用自来水洗刷，再用三次蒸馏水冲洗，最后放在玻璃仪器

气流烘干器烘干。

4.5.3 溶剂的干燥：取适量分子筛于一次性烧杯中，取适量二甲基亚砜、1,4-二氧六环、无水乙醚放入烧杯中，除水。

4.5.4 提前冷冻无水乙醚。

4.6. 操作（每步注意事项）：

4.6.1 离子液体的制备

（1）分别取 1-甲基咪唑 100g、氯丁烷 148.5mL 依次加入 500mL 的三口烧瓶中，装上冷凝管，通氩气 30min，磁力搅拌，油浴加热至 80℃，反应 24h；

（2）反应完成后，取出，冷却至室温，放入-18℃冰箱中冷冻 2h，可以看到溶液分层，倒去上层液体（主要是除氯丁烷）；

（3）放入 80℃鼓风干燥箱中，待固体完全融化，趁热加入适量甲苯，摇晃，使甲苯与溶液充分混合，冷却至室温，放入冰箱中冷冻，取出，倒去上层液体（1-甲基咪唑、氯丁烷溶于甲苯，除去甲苯、1-甲基咪唑、氯丁烷）；

（4）再重复步骤（3）两次，除尽未反应的氯丁烷；

（5）将样品放入真空干燥箱中，加热至 90℃，待完全融化后，90℃真空干燥 8h（除甲苯），取出放冷置室温，再放入干燥器中备用。

4.6.2 MPEG 的活化

（1）取二甲基亚砜 10mL、1,4-二氧六环 20mL 放入 500mL 三口烧瓶中，磁力搅拌，加入 MPEG 20g，待 MPEG 完全融化，加入 CDI 3.24g，水浴加热至 37℃反应 18h；

（2）反应完成后，在冰水浴、磁力搅拌的条件下，将样品加入预冷的无水乙醚中，用保鲜膜盖住烧杯口，将样品放入冰箱中 30min；

（3）30min 后取出，倒去上层溶液，在沉淀物中加入预冷的无水乙醚，磁力搅拌 30min，放入冰箱中 30min。

（4）再重复步骤（3）两次，充分洗去未反应的 CDI；

（5）倒去上层溶液，放入 40℃鼓风干燥箱中 6h，初步除去乙醚；

（6）放入 40℃真空干燥箱中真空干燥 2.5h，充分除去乙醚，取出放冷置室温后，再放入干燥器中备用。

4.6.3 COS-g-MPEG 的制备

（1）将离子液体在 80℃鼓风干燥箱中融化；

（2）称取离子液体 105g 放入三口烧瓶中，油浴加热至 70℃，通氩气，缓慢加入 COS 9g，待 COS 完全溶解，加入活化 MPEG 6g，磁力搅拌，所有原料加完后在氩气保护下反应 6h，反应完成后，将反应瓶冷却至室温；

（3）先用夹子夹住透析袋一侧，加入适量蒸馏水清洗三次，并检查透析袋是否漏水，然后将反应瓶中样品放入透析袋（截留分子量为 2000）中透析 72 小时，蒸馏水的用量以没过透析袋为宜。第一天 2~3h 换一次水，以后每隔 12h 换一次水。

（4）透析完成后，将溶液加入 1000mL 三口烧瓶中并置入水浴锅中，安装好减压蒸馏装置，蒸馏温度从室温分梯度升到 25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃，蒸馏至剩余 50mL 左右，撤去蒸馏装置，趁热将样品倒入一次性烧杯中，用一次性手套盖住杯口，放入-18℃冰箱中冷冻不少于 8 小时。

（5）将冷冻干燥机预冷 30min，冷冻温度达到-52℃。将样品砸碎，平铺在培养皿中，放入预冷的冷冻干燥机中，-52℃冷冻干燥 30h。冷冻完成后，关机，取出样品，称重，放入试剂袋中，放入干燥器保存。

（6）红外分析：取适量样品，用溴化钾压片，扫描范围为 400~4000cm-1，测定样品的红外光谱。

5、配制 COS-g-MPEG 的 PBS 液：

5.1 5.12%：称取 0.128 g 的 COS-g-MPEG 放入 5ml 离心管中，加 PBS 液溶解并定容至 2.5ml；

5.2 2.56%：5.12%液 1.2ml + PBS 液 1.2ml；

5.3 1.28%：2.56%液 1.2ml + PBS 液 1.2ml；

5.4 0.64%：1.28%液 1.2ml + PBS 液 1.2ml；

5.5 0.32%：0.64%液 1.2ml + PBS 液 1.2ml；

5.6 0.16%：0.32%液 1.2ml + PBS 液 1.2ml；

6、配制 PIC、COS-g-MPEG 和氯化钙溶液的帕米卡溶液：

6.1 取 PIC 液 1.0ml 放入 45℃水浴锅中，滴加 5.1 1.0ml，再滴加氯化钙溶液 0.005ml 使其终浓度为 0.0004mol/L。

6.2 取 PIC 液 1.0ml 放入 45℃水浴锅中，滴加 5.2 1.0ml，再滴加氯化钙溶液 0.005ml 使其终浓度为 0.0004mol/L。

6.3 取 PIC 液 1.0ml 放入 45℃水浴锅中，滴加 5.3 1.0ml，再滴加氯化钙溶液 0.005ml 使其终浓度为 0.0004mol/L。

6.4 取 PIC 液 1.0ml 放入 45℃水浴锅中，滴加 5.4 1.0ml，再滴加氯化钙溶液 0.005ml 使其终浓度为 0.0004mol/L。

6.5 取 PIC 液 1.0ml 放入 45℃水浴锅中，滴加 5.5 1.0ml，再滴加氯化钙溶液 0.005ml 使其终浓度为 0.0004mol/L。

6.6 取 PIC 液 1.0ml 放入 45℃水浴锅中，滴加 5.6 1.0ml，再滴加氯化钙溶液 0.005ml 使其终浓度为 0.0004mol/L。

7、结果：

MPEG，PEG，PEI 等均具有良好的水溶性，并与许多有机物组份有良好的相溶性。本实施例以 MPEG 为例，用 MPEG 和阳离子稳定剂（如壳寡糖）的接枝物与 PIC 配制，相容性明显增加，理论上用 PEG 等接枝壳聚糖等阳离子稳定剂和 PIC 配制，相容性也会增加；阳离子稳定剂上接枝上 PEG 后，接枝物本身也会兼有 PEG 的特性。

编号	PIC（2mg/ml）	COS-g-MPEG 的 PBS 溶液						$CaCl_2$（0.16mol/L）	结果	
		0.16%（1.6mg/ml）	0.32%（3.2mg/ml）	0.64%（6.4mg/ml）	1.28%（12.8mg/ml）	2.56%（25.6mg/ml）	5.12%（51.2mg/ml）		溶解度	增色效应（聚肌胞标准为≥55%）
6.1	1.0ml	1.0ml						0.005ml	澄明溶液	65.3%
6.2	1.0ml		1.0ml					0.005ml	澄明溶液	70.6%
6.3	1.0ml			1.0ml				0.005ml	澄明溶液	62.7%
6.4	1.0ml				1.0ml			0.005ml	澄明溶液	64.7%
6.5	1.0ml					1.0ml		0.005ml	澄明溶液	44.1%
6.6	1.0ml						1.0ml	0.005ml	澄明溶液	15.6%

试验结果表明，PIC：COS-g-MPEG 在 1：25.6mg 时候仍为澄清溶液，但是增色效应结果表明并不是接枝物越多越好；另外，我们将 2018-05-07 配制完的样品 6.1、6.、6.3、6.4、6.5、6.6 放置室温，2018-05-14 观察发现 6.6 的样品出现片状析出物，重新溶解不了。综合考虑，我们限定帕米卡处方中 PIC 与 COS-g-MPEG 的处方在 1：6.4mg 范围内。

二、帕米卡纳米粒子的制备

购买具有药用标准的三聚磷酸钠（TPP）在适宜比例下 PIC—COS-g-MPEG－$CaCl_2$ 复合物在恒温磁力搅拌器上以一定转速匀速搅拌，逐滴滴加不同浓度 TPP 水溶液，观察到明显的乳光立即停止，维持反应 30 分钟，通过离子交联自组装形成纳米粒子，经高速离心获得，粒径小于 1000nm。并经各种检定合格。

三、多肽或蛋白抗原纳米粒子

方案 1：多肽或蛋白抗原在上述纳米粒子形成过程中加入：各成分进入到 PEG-COS 接枝物或 COS 基质中，多肽或蛋白抗原进入含有 TPP 水相中结合。其中各成分必须合适比例并在一定 pH 环境下，磁珠搅拌结合，形成复合物及纳米粒子。

方案 2：多肽或蛋白抗原与上述预先形成的复合物及纳米粒子孵育，使多肽或蛋白抗原结合在纳复合物及米粒子表面多肽或将多肽或蛋白抗原与上述复合物及纳米粒子以一定比例混合，磁力搅拌 5 分钟，

置室温 1 小时，在甘油基质下超速离心 20000 rcf 4 ℃ 2 小时获得。

方案 1/方案 2 复合物及纳米粒子需经各项检定合格。

四、帕米卡的制剂形式

将上述复合物/含有接枝物复合物/复合物纳米粒子/多肽或蛋白抗原纳米粒子无菌装入在适宜/合格包材，制备成注射、喷雾剂或气雾剂等各种剂型，经各种产品检定合格制备成产品。

将上述复合物/含有接枝物复合物/复合物纳米粒子/多肽或蛋白抗原纳米粒子无菌装入在适宜/合格包材，制备成膏剂。

制成喷雾剂的实施例：根据上述方法配制帕米卡，将其溶液装于喷雾剂瓶中，取 20 瓶，分别进行药液的喷雾模式检测和雾滴分布的数据检测。

喷雾模式如下表所示：

客户药液		D1（cm）最大值	D2（cm）最小值	喷射距离（cm）	椭圆度（D1/D2）	椭圆度平均	全喷角度	平均全喷角度
APF 100 snap on NTS	1#	4.4	4.1	5	1.07	1.20	46	43
	2#	4.2	3.0	5	1.40		40	
	3#	4.5	3.5	5	1.29		44	
	4#	4.5	3.8	5	1.25		44	
	5#	4.2	3.7	5	1.14		43	
	6#	4.0	3.0	5	1.33		39	
	7#	4.7	4.1	5	1.15		48	
	8#	4.5	4.0	5	1.13		46	
	9#	4.0	3.7	5	1.08		42	
	10#	4.0	3.5	5	1.14		41	

说明：通过最长径与最短径的比值评价喷雾的形态（越接近 1.0，喷雾形态越佳）。

雾滴分布如下表所示：

客户药液		<10μm (%)	D10 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)	SPAN	平均
APF 100 snap on NTS	1#	1.2	55.32	115.28	187.52	1.15	1.1
	2#	1.1	48.37	98.36	166.84	1.20	
	3#	1.0	54.13	115.22	192.30	1.20	
	4#	1.3	42.18	89.78	132.54	1.01	
	5#	1.0	60.77	123.53	190.03	1.05	
	6#	1.3	51.81	111.83	173.90	1.09	
	7#	1.3	56.99	120.23	183.28	1.05	
	8#	1.4	43.88	87.50	126.41	0.94	
	9#	1.2	53.66	115.04	195.98	1.24	
	10#	1.2	53.28	125.02	197.17	1.15	

实施例 2 帕米卡联合 PEI 增加溶解度试验

参考“帕米卡联合 PEG”的配制方法（即实施例 1）进行配制，帕米卡中增加 COS 用量后出现沉淀，影响其给药的均一性，添加 PEI 后可避免出现沉淀，并增加 COS 的用量，进一步增强其免疫效果。

名称	每 1ml 样品中各成分的含量				结果
	PIC（mg/ml）	COS（mg/ml）	PEI（mg/ml）	$CaCl_2$（mol/L）	
1 组	1	0.4	0	0.0004	澄明溶液
	1	0.8	0	0.0004	澄明溶液

	1	1.6	0	0.0004	沉淀
2 组	1	0.8	32	0.0004	澄明溶液
	1	1.6	32	0.0004	澄明溶液
	1	3.2	32	0.0004	澄明溶液
	1	6.4	32	0.0004	澄明溶液

试验清楚表明帕米卡联合 PEI 后，在 PIC 中 COS 溶解度从 1.6mg/ml 提高到 6.4mg/ml，至少提高 4 倍。

CN105396130A 专利申请文献中公开了一种“皮氨钙佐剂及含有皮氨钙佐剂的疫苗”，并公开了非抗生素氨基化合物可选为壳聚糖。

本对比例采用水溶性壳聚糖（壳聚糖盐酸盐，简称 CS）替换实施例 1 中的壳寡糖，以比较二者对给药均一性方面的影响，结果见下表。

名称	PIC（mg/ml）	CS（mg/ml）	COS（mg/ml）	$CaCl_2$（mol/L）	结果
1 组	1	0.4	0	0.0004	沉淀
	1	0.8	0	0.0004	沉淀
2 组	1	0	0.4	0.0004	澄明溶液
	1	0	0.8	0.0004	澄明溶液

研究发现，水溶性壳聚糖的加入导致在配制过程中出现沉淀并且摇不散，影响其给药的均一性，而选用壳寡糖可以解决上述问题。此外，壳聚糖接枝 PEG 或水溶性壳聚糖均需要降解成小分子量壳寡糖才易被人体吸收，而壳寡糖可以直接吸收。

实施例 3 PIC 加热及分子量检测

根据实施例 1 配制的方法，配制 PIC 液，取 PIC 液 260ml，分装成 20ml/管，共 13 管，待恒温水浴锅温度升至 80-99℃时（优选 90℃），放入样品 12 管，放入后分别开始计时 10 分钟（条带 3）、20 分钟（条带 4）、30 分钟（条带 5）、40 分钟（条带 6）、50 分钟（条带 7）、60 分钟（条带 9）、70 分钟（条带 10）、80 分钟（条带 11）、90 分钟（条带 12）、100 分钟（条带 13）、110 分钟（条带 14）和 120 分钟（条带 15），每次取出 1 管。未加热的样品为条带 2。

取加热 70-120 分钟（优选加热时间 120 分钟）PIC 配制的复合物（帕米卡）及其疫苗按《中国药典》2015 版四部“1141 异常毒性检查法”均能通过小鼠和豚鼠异常毒性的检测，配制帕米卡所用的 PIC 应在 90℃加热至少 70 分钟才能用于产品的配制，优选 90℃加热时间为 120 分钟。选择未加热 PIC（条带 2）及加热 60 分钟（条带 9）配制的复合物及其疫苗不能通过豚鼠异常毒性的检测。结果如图 2 所示，对照条带 1：从下向上分别为 100bp、300bp、500bp、750bp、1000bp、1500bp、2000bp、3000bp、5000bp。对照条带 8：从下向上分别为 100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1000bp。

实施例 4 帕米卡复合物的酶降解试验

方法：将本公开实施例 1 的制备方法制备帕米卡复合物，制备完成后将帕米卡复合物和聚肌胞注射液（聚肌胞-卡那霉素-氯化钙）各样品分别稀释至 0.04mg/ml，取 13 个 10ml 管，每管加 5ml 样品稀释液，每管再分别加 sigma 的 RNA 酶（货号 R4642）25μg，放置 37℃水浴锅中，每隔 5min 中取出 1 管测 248nm 处的 OD 值，绘制曲线。

结果如图 3 所示。

实施例 5 本公开的帕米卡复合物是全新结构的复合物

（一）融化曲线峰值测定

方法：将本公开的帕米卡复合物和聚肌胞注射液各样品稀释至 0.04mg/ml，转移至 250ml 试剂瓶中，放置水浴锅，水浴锅持续升温。每隔 5℃，取 3ml 放置石英比色杯中，测 248nm 处的 OD 值，绘制曲线。

结果如图 4 所示。

试验测定结果表明本公开的帕米卡复合物（PIC-阳离子稳定剂-氯化钙）的融化曲线峰值是 85℃，聚肌胞注射液（PIC-卡那霉素-氯化钙）的融化曲线峰值是 80℃，这说明本公开的帕米卡复合物是一种全新的复合物。

（二）吸收峰扫描

按实施例 1 的制备方法，分别制备 PI 溶液、PC 溶液、PIC 溶液、PIC-COS 溶液、PIC-COS-$CaCl_2$溶液，用 PBS 缓冲液将上述样品分别稀释至 0.04mg/ml，用紫外分别测定其扫描吸收光谱，图 5 结果显示在 240-260nm 处出现的峰从高到低依次是 PI、PC、PIC、PIC-COS、PIC-COS-$CaCl_2$，其中 PIC-COS 和 PIC-COS-$CaCl_2$峰重叠，这说明本公开的帕米卡复合物（PIC-COS-$CaCl_2$）是一种全新结构的复合物。

实施例 6 PIC、COS 和氯化钙形成的部分纳米粒子

按实施例 1 的方法制备帕米卡，其中阳离子稳定剂选用 COS，金属阳离子选用氯化钙。从透射电镜图片(图 6、图 7)中可以看出，帕米卡溶液中形成了纳米粒子，大部分为球形，粒径为 50nm 左右，较均匀，个别为方形，边长超过 100nm。

实施例 7 PIC、COS-g-MPEG 和氯化钙形成的部分纳米粒子

按实施例 1 的方法制备帕米卡，其中阳离子稳定剂选用 COS-g-MPEG，金属阳离子选用氯化钙。从透射电镜图片(图 8、图 9)中可以看出，帕米卡溶液中形成了纳米粒子，大部分为方形，边长超过 100nm，少数为球形。

实施例 8 PIC、COS、TPP 和氯化钙形成的部分纳米粒子

COS 溶解在磷酸盐缓冲溶液中，按实施例 1 的方法制备 PIC 的 TPP 溶液，将 PIC 的 TPP 溶液在搅拌下缓慢滴加到 COS 溶液中，再滴加氯化钙溶液。从透射电镜图片（图 10、图 11）中可以看出，形成纳米粒子为梭形。

通过实施例 5~8 可以发现，令人惊奇的是，帕米卡复合物溶液中同时含有两种状态的物质，一种是纳米粒子（电镜结果），一种是非纳米粒子（实施例 3 电泳结果）溶液。

纳米粒子的优点是不经过胞吞作用可以直接穿透细胞膜，进入胞内，见效快；非纳米粒子溶液要通过胞吞，才能进入胞内，相对于纳米粒子见效慢。帕米卡可以通过胞吞和直接进入细胞两种模式发挥效果。此外，更为重要的是，纳米粒子的结构可以保护帕米卡，使得其免受灵长类以上包括人体血清中的核糖核酸酶对 PIC 的降解以求取代抗病毒抗肿瘤的突破获得更大效果。这些效果使得帕米卡在人体和小鼠的抗癌效果上均得以获得突出的效果。

实验例 对帕米卡复合物的免疫效果评价

在下述实验例中，若无特别提及，则帕米卡均指按实施例 1 制备的 PIC、COS 和氯化钙溶液的帕米卡溶液。

实验例 1 帕米卡复合物在重组乙肝疫苗【rHBsAg（CHO)】上的免疫效果评价

材料：rHBsAg(CHO)：20ug/ml，帕米卡佐剂：1mg/ml， ADV20 佐剂 400ug/ml，氢氧化铝佐剂：10mg/ml，生理盐水

铝佐剂/rHBsAg(CHO)：铝佐剂 0.07ml+rHBsAg(CHO)0.5 ml+生理盐水 0.43ml

ADV20（细胞因子佐剂）/rHBsAg(CHO)：ADV20 0.25ml+rHBsAg(CHO)0.5 ml +生理盐水 0.25ml

帕米卡佐剂/rHBsAg(CHO)：帕米卡佐剂 0.5ml+rHBsAg(CHO) 0.5 ml

方法：分别用铝佐剂/rHBsAg(CHO)、ADV20（细胞因子佐剂）/rHBsAg(CHO)、帕米卡/rHBsAg(CHO)于 0、14 天肌肉免疫小白鼠 0.1ml，21 天检测细胞免疫和体液免疫情况。

结果：本公开的帕米卡复合物免疫效果突出，尤其是在 ELISA 抗体和细胞免疫均有大幅度提高，显著优于铝佐剂和 ADV20（细胞因子佐剂），帕米卡是一有发展前景的免疫佐剂，详见图 12 和图 13。

实验例 2 帕米卡复合物与灭活的布氏杆菌抗原上的免疫效果评价

方法：分别用 PBS、聚肌胞注射液+灭活布氏杆菌抗原、本公开的帕米卡复合物+灭活布氏杆菌抗原免疫小鼠，0 天免疫 1 次，免疫 45 天后用布鲁氏菌强毒株攻击小白鼠，攻毒 15 天后杀鼠分离小鼠脾脏，并将脾脏的布氏杆菌培养 3 天，计数，评价本公开的帕米卡复合物+灭活布氏杆菌抗原的保护效力。

组别 鼠号	1	2	3	4	5	6	7	8	均值
空白对照组（log 值）	5.9	6.17	6.08	6.04	6.16	6.08	6.10	6.12	6.08
聚肌胞注射液+灭	5.16	5.18	3.97	3.54	4.37	4.2	-	-	4.4

活布氏杆菌抗原（log 值）									
本公开的帕米卡复合物+灭活布氏杆菌抗原（log 值）	2.59	2.78	3.32	3.11	2.88	2.9	3.81	3.02	3.05

结果：本公开的帕米卡复合物免疫效果突出，在灭活布氏杆菌抗原开发上有一定前景，本公开的帕米卡复合物+灭活布氏杆菌抗原与空白对照组的细菌分离数相差 3.03 个 log，与聚肌胞注射液+灭活布氏杆菌抗原比较，分离数相差 1.35，帕米卡复合物在灭活布氏杆菌保护效果突出。

实验例 3 帕米卡复合物与 MYO 抗原（人肌红蛋白）在制备抗体上应用

材料：MYO 抗原（人肌红蛋白），浓度 1mg/ml

本公开的帕米卡复合物，浓度 1mg/ml

完全弗氏佐剂（CFA，Sigma）

方法：准备 2.3-2.5kg 兔子，免疫前采阴性血分离血清做为对照，腹背部皮下分别多点注射不同样品后分离血清进行抗体检测。其中抗原+佐剂按 0.5ml+0.5ml 进行配制，每次免疫剂量为 1ml。

结果：

（1）分别用本公开的帕米卡复合物+MYO 抗原、完全弗氏佐剂+MYO 抗原免疫家兔，间隔 7 天免疫注射 1 次。加完全弗氏佐剂免疫 2 次（10 天）ELTSA 抗体效价 13000，加完全弗氏佐剂免疫 3 次（18 天）ELTSA 抗体效价 39000，加完全弗氏佐剂免疫 6 次（3 个月）ELTSA 抗体效价 25000；加本公开的帕米卡复合物免疫 2 次（10 天）ELTSA 抗体效价 45000，免疫 3 次（18 天）ELTSA 抗体效价 51000，免疫 6 次（3 个月）ELTSA 抗体效价 36000，帕米卡佐剂在 MYO 抗原早期抗体滴度较高，的持续期也很好，表明本公开的帕米卡复合物在 MYO 抗原上明显优于具有免疫佐剂金标准的完全弗氏佐剂，详见图 14。

（2）本公开的帕米卡复合物联合完全弗氏佐剂在 MYO 抗原免疫家兔 2 次下（0 天免疫 1 次，14 天免疫 1 次），ELISA 抗体效价（免疫后 35 天）：完全弗氏佐剂 10000，本公开的帕米卡复合物 60000，本公开的帕米卡复合物+完全弗氏佐剂为 160000（图 15）。

分别用完全弗氏佐剂+抗原、帕米卡佐剂+完全弗氏佐剂+抗原、帕米卡佐剂+抗原免疫家兔产生的抗体制备试剂盒。经临床验证用完全弗氏佐剂或完全弗氏佐剂+帕米卡佐剂抗原组产生的抗体和临床样品不匹配，不能通过临床检验，只有用帕米卡佐剂抗原产生的抗体能通过临床检验，这将完全打破荷兰 Dako 公司垄断国内的人肌红蛋白胶乳比浊试剂盒所用抗体原料的供应，解决了国内产品使用完全弗氏佐剂而普遍存在的免疫效价低，表位多样性不足，不能有效检测临床样品的严重局面。

下表是用帕米卡佐剂+抗原组产生抗体制备的试剂盒与荷兰 Dako 公司提供的抗体制备的临床正在使用的试剂盒进行比较。

人体血清	化学发光试剂盒（进口单抗制备，灵敏度高）	川至 胶乳试剂盒	豪迈 胶乳试剂盒	捷门 胶乳试剂盒	帕米卡抗原组 胶乳试剂盒
1	35	25.44	12.48	17.09	55.54
2	24	35.59	17.66	9.12	37.48
3	186	130.11	88.6	71.33	79.17
4	1200	353.25	248.66	OVER	523.29
5	47	51.65	32.91	25.35	44.2
6	74	85.55	63.5	73.74	46.54
7	18	14.89	8.91	1.32	39.13
8	37	46.42	30.05	27.58	37.21
9	54	50.46	31.37	30.51	58.14
10	56	63.63	32.12	21.78	106.3

实验例 4 帕米卡复合物在狂犬病疫苗抗原上的 NIH 效力评价

名称：本公开的帕米卡复合物在狂犬病疫苗抗原上的 NIH 效力评价

方法：分别用本公开的帕米卡复合物（1mg/ml）+抗原、聚肌胞注射液（1mg/ml）+抗原、PBS+抗原

和抗原于0天免疫小鼠，14天攻毒，28天后测定效力。

结果：见下表。

组别	配制				结果（IU/ml）
	本公开的帕米卡复合物（ml）	聚肌胞注射液（ml）	PBS（ml）	抗原（ml）	
1	0	0	0	1.0	3.5
2	0	0	0.8	0.2	1.0
3	0	0.8	0	0.2	2.0
4	0.8	0	0	0.2	3.6

结果表明：

a本公开的帕米卡复合物+CTN株狂犬病疫苗抗原保护效果是单纯CTN株狂犬病疫苗抗原的3.6倍，并节省抗原1/5；

b本公开的帕米卡复合物+CTN株狂犬病疫苗抗原保护效果是聚肌胞注射液+CTN株狂犬病疫苗抗原的1.8倍，效果突出。

实验例5 帕米卡复合物诱导小鼠多种细胞因子的产生

方法：分别用本公开的帕米卡复合物、聚肌胞注射液免疫小鼠，免疫后1小时、2小时、5小时，分别摘除小鼠眼球取血到灭菌的2ml离心管中，室温放置30分钟，3500转离心5分种，吸取上清液至一新离心管中，血清-20℃冻存。

结果：本公开的帕米卡复合物诱导的TNF-α、IFN-γ细胞因子产量明显优于聚肌胞注射液，所得到的数据均为几何平均值，具体结果见下表。

组别	诱导细胞因子产生	肿瘤坏死因子（TNF-α）pg/ml	干扰素（IFN-γ）pg/ml
空白对照	0h	2	3
聚肌胞注射液	1h	12	4
	2h	5	38
	5h	13	258
帕米卡	1h	863	32
	2h	331	71
	5h	143	285

小结：TNF-α，能杀伤和抑制肿瘤细胞，促进中性粒细胞吞噬，抗感染，是一类能直接造成肿瘤细胞死亡的细胞因子；IFN-γ能诱导细胞对病毒感染产生抗性，它通过干扰病毒基因转录或病毒蛋白组分的翻译，从而阻止或限制病毒感染，是目前最主要的抗病毒感染和抗肿瘤的细胞因子。

帕米卡诱导小鼠产生的TNF-α和IFN-γ细胞因子水平均高于聚肌胞注射液，说明本公开的帕米卡复合物诱导产生的TNF-α和IFN-γ，协同杀死肿瘤细胞和抗感染的能力更加强大。

实验例6 异常毒性检查

1、本公开帕米卡复合物的小鼠试验法：_

1.1 试验方法：

样品注射：18～22克健康SPF昆明小鼠，5只/样品，腹腔注射0.5ml/只，同时称取5只18～22g健康小鼠作为空白对照。

1.2 判定标准：

每只小鼠腹腔注射供试品0.5ml，观察7天。观察期内，小鼠应全部健存，且无异常反应，到期时每只小鼠体重应增加，供试品判为合格。如不符合上述要求，可用10只小鼠复试一次，判定标准同前。

1.3 结果：

序号	注射前体重	注射		观察天数，异常反应及死亡情况							注射后体重	结果
		剂量	途径	1	2	3	4	5	6	7		

帕米卡平行样 1（PIC 加热 120 分钟后配制）	20.2g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	33.7g	合格
帕米卡平行样 2（PIC 加热 120 分钟后配制）	20.3g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	32.6g	合格
帕米卡平行样 3（PIC 加热 120 分钟后配制）	21.4g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	33.4g	合格
帕米卡平行样 4（PIC 加热 120 分钟后配制）	19.3g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	27.3g	合格
帕米卡平行样 5（PIC 加热 120 分钟后配制）	21.2g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	31.3g	合格
帕米卡平行样 1（用未加热的 PIC 配制）	20.9g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	32.1g	合格
帕米卡平行样 2（用未加热的 PIC 配制）	20.4g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	32.2g	合格
帕米卡平行样 3（用未加热的 PIC 配制）	19.9g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	29.8g	合格
帕米卡平行样 4（用未加热的 PIC 配制）	20.1g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	30.7g	合格
帕米卡平行样 5（用未加热的 PIC 配制）	19.7g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	30.6g	合格
PBS 平行样 1	20.6g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	33.7g	合格
PBS 平行样 2	19.8g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	31.9g	合格
PBS 平行样 3	19.2g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	30.2g	合格
PBS 平行样 4	21.3g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	31.5g	合格
PBS 平行样 5	19.2g	0.5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	27.8g	合格

2 本公开帕米卡复合物的豚鼠试验法：

2.1 试验方法：

样品注射：250～350g 健康 SPF 级 Hartely 豚鼠，2 只/样品，腹腔注射 5ml/只，同时称取 2 只 250～350g 健康豚鼠作为空白对照。

2.2.判定标准：

每只豚鼠腹腔注射供试品 5ml，观察 7 天。观察期内，豚鼠应全部健存，且无异常反应，到期时每只豚鼠体重应增加，供试品判为合格。如不符合上述要求，可用 4 只豚鼠复试一次，判定标准同前。

2.3.试验结果：

序号	注射前	注射	观察天数，异常反应及死亡情况	注 射	结果

	体重	剂量	途径	1	2	3	4	5	6	7	后体重	
帕米卡平行样 1（PIC 加热 120 分钟后配制）	271g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	295g	合格
帕米卡平行样 2（PIC 加热 120 分钟后配制）	263g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	301g	合格
帕米卡平行样 1（PIC 加热 90 分钟后配制）	276g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	298g	合格
帕米卡平行样 2（PIC 加热 90 分钟后配制）	296g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	326g	合格
帕米卡平行样 1（PIC 加热 70 分钟后配制）	266g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	297g	合格
帕米卡平行样 2（PIC 加热 70 分钟后配制）	273g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	302g	合格
复合物平行样 1（PIC 加热 60 分钟后配制）	263g	5ml/只	腹腔	松毛、食欲不振、精神萎靡					死亡，体重 230g			不合格
复合物平行样 2（PIC 加热 60 分钟后配制）	277g	5ml/只	腹腔	松毛、食欲不振、精神萎靡死亡						死亡，体重 246g		不合格
复合物平行样 1（PIC 加热 50 分钟后配制）	287g	5ml/只	腹腔	松毛、食欲不振、精神萎靡死亡						死亡，体重 234g		不合格
复合物平行样 2（PIC 加热 50 分钟后配制）	293g	5ml/只	腹腔	松毛、食欲不振、精神萎靡死亡						死亡，体重 268g		不合格
复合物平行样 1（用未加热的 PIC 配制）	280g	5ml/只	腹腔	松毛、食欲不振、精神萎靡						死亡，体重 258g		不合格
复合物平行样 2（用未加热的 PIC 配制）	290g	5ml/只	腹腔	松毛、食欲不振、精神萎靡				死亡，体重 265g				不合格
PBS 平行样 1	288g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存		308g	合格
PBS 平行样 2	301g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存		334g	合格

注：复测仍不合格。

3 本公开帕米卡复合物+狂犬病疫苗纯化抗原的豚鼠试验法：_

3.1 试验方法：

样品注射：250～350g 健康 SPF 级 Hartely 豚鼠，2 只/样品，腹腔注射 5ml/只，同时称取 2 只 250～350g 健康豚鼠作为空白对照。

3.2. 判定标准：

每只豚鼠腹腔注射供试品 5ml，观察 7 天。观察期内，豚鼠应全部健存，且无异常反应，到期时每只豚鼠体重应增加，供试品判为合格。如不符合上述要求，可用 4 只豚鼠复试一次，判定标准同前。

3.3.试验结果：

序号	注射前体重	注射		观察天数，异常反应及死亡情况							注射后体重	结果
		剂量	途径	1	2	3	4	5	6	7		
帕米卡（PIC 加热 120 分钟后配制）+狂犬病疫苗纯化抗原 1	281g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	303g	合格
帕米卡（PIC 加热 120 分钟后配制）+狂犬病疫苗纯化抗原 2	273g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	316g	合格
复合物（PIC 加热 60 分钟后配制）+狂犬病疫苗纯化抗原 1	275g	5ml/只	腹腔	松毛、食欲不振、精神萎靡							238g	不合格
复合物（PIC 加热 60 分钟后配制）+狂犬病疫苗纯化抗原 2	302g	5ml/只	腹腔	松毛、食欲不振、精神萎靡				死亡			死亡，体重 266g	不合格
PBS 平行样 1	293g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	328g	合格
PBS 平行样 2	314g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	340g	合格

注：1）复测仍不合格；

2）狂犬病疫苗纯化抗原：细胞：Vero 细胞，毒种：CTN 株，（并不仅限于 Vero 细胞和 CTN 株毒种）。

4 本公开帕米卡复合物+乙型肝炎疫苗抗原的豚鼠试验法：

4.1 试验方法：

样品注射：250～350g 健康 SPF 级 Hartely 豚鼠，2 只/样品，腹腔注射 5ml/只，同时称取 2 只 250～350g 健康豚鼠作为空白对照。

4.2.判定标准：

每只豚鼠腹腔注射供试品 5ml，观察 7 天。观察期内，豚鼠应全部健存，且无异常反应，到期时每只豚鼠体重应增加，供试品判为合格。如不符合上述要求，可用 4 只豚鼠复试一次，判定标准同前。

4.3.试验结果：

序号	注射前体重	注射		观察天数，异常反应及死亡情况							注射后体重	结果
		剂量	途径	1	2	3	4	5	6	7		

帕米卡（PIC加热120分钟后配制）+乙型肝炎疫苗抗原1	263g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	299g	合格
帕米卡（PIC加热120分钟后配制）+乙型肝炎疫苗抗原2	259g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	294g	合格
复合物（PIC加热60分钟后配制）+乙型肝炎疫苗抗原1	265g	5ml/只	腹腔	松毛、食欲不振、精神萎靡							229g	不合格
复合物（PIC加热60分钟后配制）+乙型肝炎疫苗抗原2	272g	5ml/只	腹腔	松毛、食欲不振、精神萎靡					死亡，体重246g			不合格
PBS平行样1	288g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	318g	合格
PBS平行样2	294g	5ml/只	腹腔	健存	健存	健存	健存	健存	健存	健存	326g	合格

注：1）复测仍不合格；

2）乙型肝炎疫苗抗原：酵母表达（并不仅限于酵母表达，也可用重组CHO工程细胞表达乙肝抗原）。

总结分析：

PIC（双链核酸）经加热一定温度后解旋，随温度缓慢下降，两条单链又以氢键配对，恢复双链，加热能降低PIC的分子量，使其毒性降低，若PIC未经加热或加热时间不够就进行配制，这种方法配制的复合物本身毒性很大，这种复合物配制的疫苗毒性也很大，故很难应用。

实验例7 帕米卡复合物在部分晚期癌症患者及感染治疗上的应用

姓 名	性别	年龄	病 种	给药前	给药后	给药时间
林XX	女	80岁	2016.5. 颌下腺癌手术2次后多器官转移。医生预计1-2个月生存期。	卧床，恶心、呕吐，1天仅能吃1顿饭，精神萎靡。靠输血和蛋白维持。	2016年10月以来食欲逐渐增加，每天3顿饭，体重增加，精神状态良好，比医生判定的生存期延长至14个月（2016年07月～2017年09月），肌肉注射后，每次给药4mg，注射部位疼痛感，硬结，后改为喷鼻给药，每次给药4-6mg。	2016年06月—2017年07月，2017年7月停药2个月后复发去世
文XX	男	67岁	肺腺癌，2017年02月、03月分别在北京协和、天津权健医院确诊为肺癌，在纵膈处有鸭蛋大的肿瘤。	精神萎靡，未开刀，采用化疗。	每次喷鼻给药6mg，间隔1天给药1次，未发现副作用。本粘膜免疫制剂联合化疗药物（顺铂）后副作用降低，几乎没有恶心呕吐，白血球从未用药1000-2000至3000多/mm^3。	2017年03月—06月，患者家属于2017年10月又主动取药（健在）。
朱XX	女	62岁	吉林省肿瘤医院2017.5.8诊断右乳腺癌并肝内多发转移	两次化疗后副作用严重，体重下降，恶心呕吐，肿瘤增大。转氨	2017年05月04日开始间隔一天用药一次，先喷鼻给药4mg/次，再肌注2mg/次，如此循环给药，10余次后患者自述无副作用，联合化疗药物后，显著降低化疗的副作用，饮食	2017年05月—2017年08月主诉生活质量显著提高，回

			癌，淋巴结见纤维组织内癌细胞巢。	酶高。	增加，体力增加，乳房肿物变软。谷丙转氨酶从 130.5U/L 降到 38.4U/L。2017.4.09 肝最大低回声晕环 7.6×5.1cm;至 2017.06.02 降为 5.9×3.0cm。	东北老家吸大烟造成肝衰竭很快去世。
王 XX	女	73 岁	2002 年结肠癌手术，2008 年乳腺癌手术，2015 年肺癌手术，2017 年 4 月肺癌放疗、化疗。	无食欲，无味觉，睡眠轻，倦怠无力，轻度脱发，胃动能差，咳嗽并服用止咳药，无治疗。	2017 年 05 月 27 日开始间隔一天用药一次，喷鼻给药 4mg/次，给药 6 次后，患者本人及家属反馈无副作用，饮食增加，肿瘤减小，咳嗽缓解明显，停止服用止咳药物。 2018 年 03 月 29 日化验结果：1）癌胚抗原 1.93，参考值 0-5ng/ml；2）糖类抗原 CA153 为 9.2，参考值 0-25IU/ml；3）糖类抗原 CA-125 为 1.2U/ml，参考值 0-35U/ml；4）糖类抗原 CA19-9 为 6.24,参考值为<39U/ml；5）糖类抗原 CA-724 为 0.72，参考值 0-6.9U/ml;6)神经元特异性烯醇化酶 12.36，参考值 0-16.3ng/ml；7）便潜血 0，参考值＜100ng/ml.	2017年05月—至今（健在）
高 XX	女	72 岁	喉癌；2014 年进行手术，手术后未进行任何药物治疗，2016 年初复发。	体力不支（有限范围内活动）、疲倦、食欲不振、喘气困难，睡觉容易憋醒	间隔 2 天给药，每次肌注给药 2mg，半个月后，疲劳症状缓解，可以上街赶集，食欲增加，喘气困难缓解，可以睡个安稳觉，病人感觉明显变好，耐受性良好，无明显不良反应，放弃服用止疼药；后患者肿瘤内给药，间隔 2 天给药，每次注射皮肤表明肿瘤 2mg，注射 7 次后皮肤表面肿瘤化脓后消失。	2016 年 04 月—2017年01月（去世）
白 XX	男	59 岁	食道癌；2016 年 6 月份左右在监狱发现癌症，由苏家村委会从监狱领回村里，未接受任何治疗，病人口述为良性肿瘤。	冒虚汗、疲倦、食欲不振（仅能吃 1 个鸡蛋羹）、喘气困难、浑身不舒服。	隔天肌注给药一次，每次给药 2mg，首次给药半个月后，食欲大增（一顿能吃 7、8 个鸡蛋羹，还能喝酒），体重增加，病人感觉明显变好，精神面貌改善，无发热，不拉肚子，无明显不良反应，无手脚发热情况，体温正常，不冒虚汗，注射部位无疼痛。	2016 年 08 月—2017 年 02 月，停药 2 个月去世。
郑 XX	男	48 岁	肝癌；肝切掉三分之一，胆切除，吃止疼药。	体力不支（有限范围内活动）、疲倦、食欲不振。	隔天肌注给药一次，每次给药 2mg，首次给药 4 天后，疲劳症状缓解，体力增加，停止用药，几天后又继续使用，疼痛症状缓解，放弃服用止疼药，食欲增加	2016 年 09 月—2017年01月（健在）
齐 XX	男	50 岁	肺癌；2016 年发现，未进行治疗，仅服消炎、止疼类药物。	卧床、体力不支（拄拐及搀扶才能行走）、骨瘦如材（50 斤）、疲倦、食欲不振、喘气困难、胸水每天半斤左右。	隔天肌注给药一次，每次给药 2mg，首次给药半个月后，疲劳症状缓解，可以扔掉拐棍并行走到院外，食欲增加，胸水未见明显缓解，用药后出现发热（未测体温）、拉肚子。	2016 年 08 月—10 月（去世）
赵 xx	女	63 岁	乳腺癌；手术后经两次化疗。	肺、肝、骨多处转移，恶心，厌食	2017 年 5 月初开始用帕米卡，隔日一次，每次喷鼻给药 3.6mg，无副作用，正常饮食，有力气，未用帕米卡前转氨酶极高无法进行化疗，用药后转氨酶正常，接受了第三次化疗。一个月后医院检测报告肝转移癌从 7.5×5.3cm 降至 5.9×3.5cm。7 月 18 日电话告知，肝瘤缩小至约 5cm，已与正常人一样感觉（医院检测报告）。	2017年05月—至今（健在）

姬 XX	男	64 岁	2017.11.13 北医三院确诊为晚期肺癌	全身多发性骨转移，肺炎，肺栓塞等，血清骨胶素 CYFRA21-13.04ng/ml，癌胚抗原 298.50ng/ml 颈淋巴结肿大，背臀骶尾疼痛，住院后逐日增加杜冷丁解痛至 5 针/日，仍疼痛不缓解	2017.11.14 开始使用帕米卡鼻腔喷雾剂，隔日一次喷鼻给药，3.6mg/次（患者体重 90 公斤）。同时口服吉非替尼，1 片/日。10 天后疼痛逐日消失，每天少打 1 针杜冷丁，至完全不用杜冷丁，疼痛完全消失。癌胚抗原（2017.12.1）174.50ng/ml。（用药前为 298.50ng/ml。2017.12.7.CT 影像报告单：两肺多发 5mm 以下结节影，左肺下叶可见片状密度增高影，边界清楚，气管及支气管开口通畅，纵隔内未见肿大淋巴结。影像诊断：两肺小结节影，建议随访观察，左下肺慢性炎症。	2017年11月—至今（健在）
林 XX	男	73 岁	咽喉炎	咽痛、伴咳嗽、黄痰、脓鼻涕	帕米卡喷咽部，几次后咽痛咳嗽明显好转，大约 3 天痊愈，免去以往必须吃抗生素。没有副作用。	2017 年 11 月 20 日-2017 年 11 月 22 日

从多例晚期癌症病例可以看到本品除注射给药途径外，还可通过鼻腔喷雾给药，对转移癌效果明显。

（1）安全性良好，未见明显副作用；帕米卡免疫制剂是非细胞毒性药物。

（2）能降低放化疗副作用：提高白细胞数和血清蛋白含量。

（3）临床效果显著：减轻疼痛、食量增加、体力增加，精神由悲观到乐观、有信心，总生存期已延长数月，有病例延长 13 个月；

（4）对转移癌体积缩小明显，有病例显示肿瘤缩小 1/3-1/2。

实验例 8 稳定性检测

本公开帕米卡复合物生产完成后避光储存于室内，每隔 6 个月对样品进行检测一次

检 项	**聚肌胞注射液**	**帕米卡 P-20170801 批**		**帕米卡 P-20170802 批**	
保存条件	在凉暗处（不超过 20℃）保存	室温保存 0 个月	室温保存 6 个月	室温保存 0 个月	室温保存 6 个月
性状	澄清溶液	澄清溶液	澄清溶液	澄清溶液	澄清溶液
荧光反应	荧光增强	荧光增强	荧光增强	荧光增强	荧光增强
pH	6.8	6.66	6.51	6.85	6.48
增色效应	58.1%	70.5%	65.7%	71.0%	67.7%
分子量	25～500kD	100-1500bp	100-1500bp	100-1500bp	100-1500bp
含量	94.2%	95.8%	102.3%	91.3%	95.3%
无菌检查	合格	合格	合格	合格	合格
细菌内毒素	＞100EU/ml	＜10EU/ml	＜10EU/ml	＜10EU/ml	＜10EU/ml

结果：样品室温（北京 8-9 月室温都超过 30 度）储存 6 个月内，产品检测指标未发生明显的变化，说明产品比较稳定；配制 1mg/ml 的帕米卡至少可达到 12 个月的稳定性；配制 3mg/ml 的帕米卡至少可达到 9 个月的稳定性。该产品的 pH 比较稳定，放置 3 年以内，pH 变化不大。本公开的帕米卡细菌内毒素小于＜10EU/ml，而聚肌胞注射液的细菌内毒素大于 100EU/ml，本领域公知技术细菌内毒素是革兰氏阴性菌的细胞壁成分，当细菌死亡或自溶后便会释放出内毒素。因此，细菌内毒素广泛存在于自然界中。如自来水中含内毒素的量为 1 至 100EU/ml。当内毒素通过消化道进入人体时并不产生危害，但内毒素通过注射等方式进入血液时则会引起不同的疾病。内毒素小量入血后被肝脏枯否细胞灭活，不造成机体损害。内毒素大量进入血液就会引起发热反应"热原反应"。因此，生物制品类、注射用药剂、化学药品类、放射性药物、抗生素类、疫苗类、透析液等制剂以及医疗器材类(如一次性注射器，植入性生物材料)必须经过细菌内毒素检测试验合格后才能使用。

实验例 9 帕米卡促进巨噬细胞吞噬功能测定

地点：中国医学科学院药物研究所

方法：巨噬细胞的收集：准备 20～25 克的 SPF 级昆明小白鼠 6 只，随机分为 2 组，每组 3 只。于 0 天免疫帕米卡和 PBS，每只小鼠滴鼻 200μL，2 小时后每只小鼠腹腔再注射 5.0%鸡红血球的 0.85%生理盐水悬液，4 小时后每组小鼠各脱臼处死小白鼠 3 只。消毒后剪开皮肤并经腹膜注射 Hanks 缓冲液，每只注射 2.5mL，轻揉小鼠腹部，使 Hanks 缓冲液充分涮洗腹腔内的巨噬细胞。然后在腹膜中间部位剪一小孔，用 5mL 移液管吸取腹腔内液体约 2mL 置于试管中。

滴片：从试管中无菌吸出腹腔洗液，滴于载玻片上，将滴片水平放入湿纱布上，置 37℃恒温培养箱中温育半小时，此时即有大量的巨噬细胞粘附于载玻片上，用 0.85%生理盐水冲洗去载玻片上未被吞噬的鸡红细胞及其他组织细胞，冷风吹干。

标本的固定和染色：标本用甲醇固定 5 分钟，以姬姆萨-瑞氏染液染色。按姬姆萨氏染色法进行，所用 PBS 缓冲液 pH 调整为 6.5，冷风吹干后用油镜观察并计算。

吞噬百分数：吞噬红血球的巨噬细胞总数÷巨噬细胞总数×100%。

吞噬指数：巨噬细胞吞噬红血球总数÷吞噬红血球的巨噬细胞总数×100%（在油镜下观察 100 个巨噬细胞，记录每个巨噬细胞吞噬红血球数，求其总和被 100 除，所得数值即为吞噬指数）。

结果：在 PBS 对照组吞噬百分数 12%，吞噬指数为 0.11；帕米卡组吞噬百分数 66%，吞噬指数为 1.2，表明帕米卡具有强烈刺激巨噬细胞吞噬功能作用，下列图 16 巨噬细胞吞噬红血球，图 17 蓝色巨噬细胞（箭头所示）没有吞噬红血球。

实验例 10 帕米卡滴鼻剂粘膜免疫制剂单独抗流感小白鼠保护试验

流感病毒：亚甲型鼠肺适应株 FM1，购于中国预防医学科学院病毒病防治研究所。

病毒唑：阳性对照药，购于沈阳延风药厂。

小白鼠：昆明种，8～10g 用于 FM1 病毒传代，14～20g 用于如下正式实验。

将流感病毒 FM1 株病毒鼠肺悬液用 5 LD_{50}/只通过对小白鼠滴鼻可造成致死性肺炎，试验时先感染再给药，按下表进行分组试验。

组　　别	给药剂量	死亡率 %	X^2	P 值
FM1 流感病毒小白鼠适应株	生理盐水	89		
病毒唑阳性对照	0.07g/kg/d	63	1.64	＞ 0.05
本公开单独的滴鼻剂	0.1ml/只小白鼠	43	3.88	＜ 0.05

该实验结果表明在小白鼠保护试验中本公开单独的滴鼻剂经粘膜免疫途径非特异性抗流感效果就优于公认的抗病毒药病毒唑，统计学分析具有显著的抗流感病毒效果。

实验例 11 帕米卡粘膜免疫制剂（滴鼻剂）联合流感疫苗经鼻腔粘膜免疫与皮下注射免疫和完全弗氏佐剂比较对体液抗体 IgA 和对流感病毒繁殖滴度的影响

实验方案如下：

流感病毒：亚甲型鼠肺适应株 FM1，购于中国预防医学科学院病毒病防治研究所。

流感疫苗：流感病毒裂解疫苗 华兰生物制品有限公司

完全弗氏佐剂：上海伟进生物科技有限公司

本公开的粘膜免疫佐剂：信福（北京）医药科技有限公司

小白鼠：昆明种，8～10g 用于 FM1 病毒传代，14～20g 用于如下正式实验。

完全弗氏佐剂流感疫苗：在离心管内，在漩涡混匀加入等体积的疫苗和完全弗氏佐剂呈油包水乳剂。

本公开联合流感疫苗的滴鼻剂：流感疫苗和本公开的粘膜免疫佐剂等量混合呈水溶剂。

流感疫苗：流感疫苗与 PBS 等量混合成水溶剂。

免疫方法：

皮下注射免疫：皮下 0 天、28 天注射免疫小白鼠，0.1ml/只，第 42 天，部分小白鼠抽血分离血清，检测抗体滴度，另部分小白鼠通过流感病毒 FM1 株病毒鼠肺悬液 5 LD_{50}/滴鼻感染，感染后第 5 天，检测肺组织病毒滴度。

鼻腔免疫：滴鼻法 0 天、28 天免疫小白鼠，0.1ml/只，第 42 天，部分小白鼠抽血分离血清，检测

抗体滴度，另部分小白鼠通过流感病毒 FM1 株病毒鼠肺悬液 5 LD_{50}/滴鼻感染，感染后第 5 天，检测肺组织病毒滴度。

各组实验结果如下表所示：

粘膜免疫制剂联合流感疫苗滴鼻法抗流感试验

组 别	抗体指数	治疗后流感病毒滴度
皮下注射免疫：		
流感疫苗	$10^{3.1}$	10^{4}
完全弗氏佐剂流感疫苗	$10^{5.5}$	$10^{3.5}$
本公开联合流感疫苗的滴鼻剂	$10^{4.5}$	$10^{2.0}$
鼻腔粘膜免疫：		
流感疫苗	$10^{2.5}$	$10^{4.5}$
本公开联合流感疫苗的滴鼻剂	10^{4}	＜10
FM1 病毒对照	$10^{5.0}$	

完全弗氏佐剂是检测促进机体细胞免疫的金标准，试验结果表明皮下免疫本公开粘膜免疫制剂联合流感疫苗产生抗体较完全弗氏佐剂流感疫苗低 10 倍，但较完全弗氏佐剂流感疫苗降低流感病毒滴度 31.6 倍;特别是通过小白鼠鼻腔粘膜免疫表明本公开粘膜免疫制剂与抗原结合后的滴鼻剂较单纯流感疫苗抗体高 31.6 倍，降低流感病毒滴度 3100 多倍，具有极其显著的效果。

实验例 12 帕米卡对 CIK 细胞效靶实验的初步测试具有明确效果

北京京蒙高科干细胞技术有限公司检测本公开对 CIK 细胞效靶实验的初步测试具有明确效果。

样本编号：JSCIK2016042614；检测日期：2016.04.26；报告日期：2016.04.28。

操作流程：按照常规的 CIK 细胞效靶实验进行培养和分析，实验方法例如（庄捷等，树突状细胞与 CIK 细胞共培养诱生的 DCCIK 细胞群对肿瘤的杀伤作用，细胞生物学杂志，2007,29；237-240）所示。

靶细胞：A549 效应细胞：培养 JSCIK2016042614

结论：结合荧光显微镜和酶标仪检测方法以及实验本身误差，对 JSCIK2016042614 细胞杀伤能力进行综合分析，1:10 的杀伤效果为中（靶效比为 1:10 时，对靶细胞 A549 的杀伤率为 51.4%）。

实验例 13 帕米卡粘膜免疫制剂对荷瘤小白鼠 LL2 肺癌模型的抗癌作用

用 LL2 小白鼠移植瘤模型通过鼻腔喷雾检测帕米卡的抗肿瘤效果，该模型瘤细胞生长迅速，接种 14 天肿瘤体积已达 2201.9±68.01mm3，实验即告结束，其中阳性对照顺铂对肿瘤缩小最好，其次是帕米卡肌肉注射组，但帕米卡鼻腔喷雾除 0.1mg/只小白鼠外。其余 0.2mg/只各鼻腔喷雾组与溶媒阴性对照组比 $P<0.0001$，具有及其显著的差异。特别是与历史资料在相同小白鼠模型中，鼠型 PD1 几乎没有效果。需要解释的是顺铂组在细胞分裂十分迅速的该模型中更易表现其效力，综合考虑帕米卡在新抗癌机制下的这样的荷瘤小白鼠模型的效果是引人瞩目的。另外在该模型中没有发现对小白鼠的副作用。

实验分组如下表所示：

Treatment	TV at day 14	T/Cb (%)	*p*value
Vehicle	2201.09±68.01	--	--
顺铂(5mg/kg)	637.79±62.87	28.9	<0.0001
Pamica-1(200 μg, 即时给药，滴鼻)	1331.51±139.21	60.4	<0.0001
Pamica-1(200 μg，滴鼻)	1163.83±52.88	52.8	<0.0001
Pamica-1(150 μg, 滴鼻)	1839.36±83.57	83.5	0.0667
Pamica-1(200 μg, 肌肉注射)	929.69±109.95	41.7	<0.0001

Pamica-1+顺铂(200 μg+5 mg/kg，滴鼻+I.V)	799.63±82.86	36.3	<0.0001

具体实验结果如图 18~21 所示。

在本次实验中，细胞成瘤率高，溶媒对照组肿瘤生长迅速，实验结束时肿瘤体积达到 2201.09 ± 68.01 mm^3，阳性对照组顺铂表现出明显的抑瘤效果，表明本次实验成功，结果可信。

试验结果显示，在本次对小鼠肺癌 LL2 细胞 C57BL/6 小鼠移植瘤模型的研究中，除帕米卡，150 μg/鼠组外，其余组无论是滴鼻还是肌肉给药均表现出明显的抑制肿瘤生长的作用，统计学测定显示具有极其显著差异，$P<0.0001$；同时对荷瘤小鼠无明显毒副作用。

辉源生物之前的数据显示，鼠源性的 PD-1 抗体在 LL2 模型上药效较弱（抑瘤率小于 10%），作为同样作用于免疫系统的帕米卡，展示的效果要优于 PD-1 抗体。通常认为 PD-1 抗体的抗肿瘤药效取决于肿瘤细胞 PD-L1 的表达水平，或者与 mutation load, 微卫星不稳定性（MSI-H）或者错配修复缺陷（dMMR）有关，进而影响其药物效果。作为免疫佐剂类的帕米卡展示的抑瘤效果，比免疫检查点的范围更为广泛，显示了极大的开发前景。

实验例 14 帕米卡对 4T1-luc 小鼠原位乳腺癌模型的体内抗肿瘤效果研究

本次药效学实验共设 9 个组：溶媒组、PD1 组、6 个帕米卡治疗组、帕米卡与 PD1 联合给药组。其中，溶媒组为接种后 16 天滴鼻给予 PBS 溶液 66.7μL/只，每两天给药一次；PD1 组为接种后 16 天腹腔注射 PD1 溶液 100μg/只,每周给药一次;6 个帕米卡治疗组分别为:接种前 7 天滴鼻给予帕米卡 200 μg/只，每两天给药一次；接种当天滴鼻给予帕米卡 200 μg/只，每两天给药一次；接种后 16 天滴鼻给予帕米卡 200 μg/只，每两天给药一次；接种后 16 天滴鼻给予帕米卡 300 μg/只，每两天给药一次；接种后 16 天肌注给予帕米卡 200 μg/只，每两天给药一次；接种后 16 天肌注给予帕米卡 300 μg/只，每两天给药一次；帕米卡与 PD1 联合给药组为接种后 16 天滴鼻给予帕米卡 200 μg/只，每两天给药一次+接种后 16 天腹腔注射 PD1 溶液 100μg/只，每周给药一次。实验采用雌性 Balb/c 小鼠，每三天测量一次瘤体积，每两天称量一次体重。在溶媒对照组平均瘤体积超过 2000 mm^3 时结束实验，小动物活体成像仪测定肿瘤生物发光情况，最后取各组小鼠脏器进行 HE 染色。

药效学试验结果显示，提前 7 天组和第 0 天组抑制肿瘤生长和转移的能力较弱，两帕米卡肌注组对肿瘤生长和转移的抑制作用强于两帕米卡滴鼻组，除 200 μg/只帕米卡滴鼻组外，300 μg/只帕米卡滴鼻组、200 μg/只帕米卡肌注组和 300 μg/只帕米卡肌注组均能显著的抑制肿瘤生长和转移。实验结束时，200 μg/只帕米卡滴鼻组和 300 μg/只帕米卡滴鼻组的肿瘤抑制率分别为 25%和 35%。200 μg/只帕米卡肌注组和 300 μg/只帕米卡肌注组的肿瘤抑制率分别为 56%和 61%。

以上结果说明，帕米卡对 4T1 乳腺癌具有良好的抑制肿瘤生长和转移的作用。

下面对实验流程和实验结果进行具体论述。

1. 实验方法

1.1 4T1-luc 小鼠原位乳腺癌瘤模型的构建

取雌性 Balb/c 小鼠，选择处于对数生长期的 4T1-luc 乳腺癌细胞，以 1×105 个/0.2 mL/只的数量接种于 Balb/c 小鼠第四乳腺垫下，构建原位荷瘤小鼠模型。以游标卡尺动态测量瘤块体积。肿瘤体积计算公式：V=0.5×L×D2（其中，V 为肿瘤体积，L 为肿瘤长径，D 为肿瘤短径）。

1.2 给药时间设置

接种前 7 天帕米卡滴鼻给药组（简称提前 7 天组），种瘤前 7 天随机挑选 10 只小鼠，按表 1 开始给药；

接种第 0 天帕米卡滴鼻给药组（简称第 0 天组），种瘤当天随机挑选 10 只小鼠，按表 1 开始给药；

溶媒组，肿瘤体积生长至 80 mm^3 左右，即种瘤后第 16 天，按表 1 开始给药；

PD1 组，肿瘤体积生长至 80 mm^3 左右，即种瘤后第 16 天，按表 1 开始给药；

200 μg/只帕米卡滴鼻组：肿瘤体积生长至 80 mm^3 左右，即种瘤后第 16 天，按表 1 开始给药；

300 μg/只帕米卡滴鼻组：肿瘤体积生长至 80 mm^3 左右，即种瘤后第 16 天，按表 1 开始给药；

200 μg/只帕米卡肌注组：肿瘤体积生长至 80 mm^3 左右，即种瘤后第 16 天，按表 1 开始给药；

300 μg/只帕米卡肌注组：肿瘤体积生长至 80 mm^3 左右，即种瘤后第 16 天，按表 1 开始给药。

表 1 实验给药剂量及分组

	受试样品	动物	给药途径	剂量	给药频次
1	溶媒	16	滴鼻	66.7μL	两天一次
2	PD1	16	腹腔	100 μg/只	一周一次
3	帕米卡	16	滴鼻（接种后 16 天给药）	200 μg/只	两天一次
4	帕米卡	16	滴鼻（接种后 16 天给药）	300 μg/只	两天一次
5	帕米卡	16	肌注（接种后 16 天给药）	200 μg/只	两天一次
6	帕米卡	16	肌注（接种后 16 天给药）	300 μg/只	两天一次
7	帕米卡	10	滴鼻（接种前 7 天给药）	200 μg/只	两天一次
8	帕米卡	10	滴鼻（接种后 0 天给药）	200 μg/只	两天一次
9	帕米卡+PD1	10	滴鼻+腹腔	200 μg/只+100 μg/只	两天一次+一周一次

1.3 实验终点

在给药后的第 30 天因肿瘤体积超过 2000 mm^3 结束整个实验。

1.4 观察指标

每三天测量一次瘤体积，每两天称量一次体重。实验终点时剥离心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肿瘤，其中，心脏、肝脏、脾脏、肾脏用 4%中性甲醛固定后，石蜡切片并进行 HE 染色分析；肿瘤拍照并称重；肺脏用 Bouin’s 固定液固定 16 h，然后用 50%酒精浸洗 2 h 后拍照，用 4%中性甲醛固定后，石蜡切片并进行 HE 染色分析。

1.5 小动物活体成像仪

给药终点时腹腔注射给予 100 μL 浓度为 30 mg/mL 的荧光素底物 Luciferin，以异氟烷麻醉小鼠，17 min 后将小鼠固定于小动物活体成像仪中观察生物发光情况。图像采集参数为：采集时间，0.2 秒；Bin 值为 4；F 值为 2。图像处理软件：Living Image® software（version 4.3.1；Caliper Life Sciences Inc.）。

2．统计学分析

实验数据均以“均值±标准差”表示，数据分析采用 SPSS Statistics 19（version 4.0.100.1124；SPSS Inc.，IBM Company，USA）软件。数据比较采用单因素方差分析 ANOVA，组间显著性差异采用 t 检验：* $p < 0.05$；** $p < 0.01$；*** $p < 0.001$。

3．实验结果及讨论

3.1 肿瘤体积

肿瘤体积变化曲线如图 22 所示。

表 2 肿瘤体积 t 检验结果

	6 天	12 天	18 天	24 天	30 天
提前 7 天组					**
第 0 天组				**	*
PD1		**		——	——
200 μg/只帕米卡滴鼻	**	**			*
300 μg/只帕米卡滴鼻	**	*		**	*
200 μg/只帕米卡肌注	**	***	*	***	***
300 μg/只帕米	***	***	***	***	***

卡肌注					
200 μg/只帕米卡滴鼻+PD1	*	**	***	——	——

Note：误差线表示 SD；——表示无数据。。*：表示与溶媒组相比 $p<0.05$；**：表示与溶媒组相比 $p<0.01$；***：表示与溶媒组相比 $p<0.001$。

由图 22 和表 2 可知，提前 7 天组和第 0 天组抑瘤效果较弱，两肌注组的抑瘤效果好于两滴鼻组，具体结果如下。

帕米卡提前 7 天组和第 0 天组在后期时具有一定的抑瘤作用，前期基本无抑瘤效果，说明提前给药或者当即给药没有明显的肿瘤杀伤效果，侧面证明帕米卡是一种肿瘤治疗疫苗，而不是预防疫苗。实验结束时，提前 7 天组和第 0 天组的肿瘤抑制率分别为 36%和 26%.

PD1 组在第 12 天时的肿瘤体积与溶媒组相比均有显著性差异（**$p<0.01$），说明 PD1 对 4T1 小鼠乳腺癌具有一定的抑制作用。

PD1 和帕米卡联合给药组各治疗组在给药后 20 天，大部分小鼠已死亡，因此后期的测定两组均无数据。其中，联合给药组在第 6、12、18 天时的肿瘤体积与溶媒组相比均有显著性差异（分别为*$p<0.05$，**$p<0.01$， ***$p<0.001$）。

200 μg/只帕米卡滴鼻组在给药前期抑制效果较明显，给药后期抑瘤效果逐渐减弱，在第 6 天和第 12 天的的肿瘤体积与溶媒组相比均有显著性差异（**$p<0.01$），300 μg/只帕米卡滴鼻组除第 18 天之外，其余时间时的肿瘤体积与溶媒组相比均有显著性差异。说明滴鼻给药有效且抑瘤作用呈剂量依赖性。实验结束时，200 μg/只帕米卡滴鼻组和 300 μg/只帕米卡滴鼻组的肿瘤抑制率分别为 25%和 35%。

帕米卡两个肌注剂量组在整个给药过程中的抑瘤效果相似，并且与溶媒组相比均有显著性差异，且两肌注组的抑瘤效果好于两滴鼻组。实验结束时，200 μg/只帕米卡肌注组和 300 μg/只帕米卡肌注组的肿瘤抑制率分别为 56%和 61%。

3.2 体重

小鼠体重变化曲线如图 23 所示。

表 3 各组小鼠与溶媒组小鼠体重 t 检验统计学结果

	0 天	2 天	4 天	6 天	8 天	10 天	12 天	14 天
提前 7 天组	**	**	**	**	***	**	**	***
第 0 天组	***	***	**	**	**	**	**	***
PD1								
200 μg/只帕米卡滴鼻		*	*	**	**	***	***	***
300 μg/只帕米卡滴鼻		**	***	***	**	***	***	***
200 μg/只帕米卡肌注								
300 μg/只帕米卡肌注		**	*					
200 μg/只帕米卡滴鼻+PD1			*		**	**	**	***

	16 天	18 天	20 天	22 天	24 天	26 天	28 天	30 天
提前 7 天组	***	***	*	*	*	*		
第 0 天组	***	**	**	**	*			
PD1				——	——	——	——	——
200 μg/只帕米卡滴鼻	***	***	***	**	*	*		
300 μg/只帕米卡滴鼻	***	**	**	**	**	**	*	
200 μg/只帕米卡肌注								
300 μg/只帕米卡肌注				*	*	*		
200 μg/只帕米卡滴鼻+PD1				——	——	——	——	——

Note：误差线表示 SD；——表示无数据。*：表示与溶媒组相比 $p<0.05$；**：表示与溶媒组相比 $p<0.01$；***：表示与溶媒组相比 $p<0.001$。

由图 23 和表 3 可知，PD1 和联合给药组小鼠体重在有效测定的时间内与溶媒组相比均无显著性差异，提示其副作用较小。提前 7 天组、第 0 天组、200 μg/只帕米卡滴鼻组和 300 μg/只帕米卡滴鼻组除在给药后期外，其余时间的体重均明显低于溶媒组。200 μg/只帕米卡肌注组在整个给药期间内与溶媒组相比均无显著性差异。300 μg/只帕米卡肌注组在给药中期体重低于溶媒组，给药前期和后期与溶媒组相比均无显著性差异。

以上结果说明，肌注给药对小鼠的体重影响较小，副作用较小，滴鼻给药对小鼠具有一定的副作用。

3.3 瘤重、脾重及肿瘤照片

由图 24 和图 25 可以看出，提前 7 天组和第 0 天组的瘤重与对照组相比无显著性差异，两帕米卡肌注组对肿瘤生长的抑制作用强于两帕米卡滴鼻组，除 200 μg/只帕米卡滴鼻组外，300 μg/只帕米卡滴鼻组、200 μg/只帕米卡肌注组和 300 μg/只帕米卡肌注组均能显著的抑制肿瘤生长，与溶媒组相比具有统计学差异（分别为*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001）。

脾脏是机体最大的免疫器官，占全身淋巴组织总量的 25%，含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞，是机体细胞免疫和体液免疫的中心。由图 26 可以看出， 200 μg/只帕米卡肌注组和 300 μg/只帕米卡肌注组脾重均显著高于溶媒组，具有统计学差异（分别为**p<0.01，*p<0.05），说明肌注组免疫反应可能较强烈。

3.4 肺脏照片

由图 27 和图 28 可以看出，溶媒组、提前 7 天组、第 0 天组肺脏组织表面均有较多白色肿瘤结节，说明提前 7 天组和第 0 天组基本无抑制 4T1 肺转移的作用。200 μg/只帕米卡滴鼻组和 300 μg/只帕米卡滴鼻组肺脏组织表面结节较少，200 μg/只帕米卡肌注组和 300 μg/只帕米卡肌注组肺脏组织表面结节最少，说明此两滴鼻组和两肌注组均能有效抑制 4T1 肺转移，且肌注组抑制 4T1 肺转移能力强于滴鼻组。

3.5 小动物成像仪

由图 29-图 35 可以看出，溶媒组、提前 7 天组、第 0 天组肿瘤部位和转移灶生物发光强度较强，200 μg/只帕米卡滴鼻组和 300 μg/只帕米卡肿瘤部位和转移灶生物发光强度减弱，200 μg/只帕米卡肌注组和 300 μg/只帕米卡肌注组肿瘤部位和转移灶生物发光强度最弱，说明肌注组抑制 4T1 乳腺癌生长和转移能力强于滴鼻组，与上述结果相符。

4. 结论

在本次实验中，我们成功建立了 4T1-luc 小鼠原位乳腺癌模型，肿瘤生长迅速，实验结束时肿瘤体积超过 2000 mm^3。

试验结果显示，在本次对小鼠乳腺癌 4T1-luc 细胞 Balb/c 小鼠原位肿瘤模型的研究中，除 PD1 和联合给药组小鼠由于 PD1 的原因出现了小鼠大面积死亡导致只得到部分实验数据外，其余各组均在一定的时间具有一定的抑瘤作用。提前 7 天组、第 0 天组和 200 μg/只帕米卡滴鼻组抑瘤作用不明显，200 μg/只帕米卡滴鼻组、200 μg/只帕米卡肌注组和 300 μg/只帕米卡肌注组均表现出明显的抑瘤作用。

实验例 15 帕米卡在人乳头瘤病毒（HPV）感染患者治疗上的应用

姓名（性别，年龄）	给药前	给药方法	给药后	给药时间
张 X（女，28 岁）	高危型人乳头瘤病毒感染（阳性-HPV16 感染）	间隔 1 天喷雾给药 1 次，每次 2.4mg	高危型人乳头瘤病毒 HPV16 转为阴性	2017-08-09 至 2018-01-05
张 XX（女，30 岁）	高危型人乳头瘤病毒感染（阳性-HPV18 感染）	间隔 1 天喷雾给药 1 次，每次 2.4mg	高危型人乳头瘤病毒 HPV18 转为阴性	2017-11-04 至 2018-01-25
曲 XX（女，34 岁）	高危型人乳头瘤病毒感染（阳性-HPV18 感染）	间隔 1 天喷雾给药 1 次，每次 2.4mg	高危型人乳头瘤病毒 HPV18 转为阴性	2017-10-23 至 2018-01-13

实验例 16 帕米卡在乳腺癌治疗上的应用

1、阳性对照药：

PD1、紫杉醇注射液

2、荷 4T1 小鼠原位乳腺癌动物模型的构建

取雌性 BALB/c 小鼠，选择处于对数生长期的 4T1-luc 乳腺癌细胞，以 1×10^5cells/0.2 mL/只的数量接种于 BALB/c 小鼠第四乳腺垫下，构建原位荷瘤小鼠模型。以游标卡尺动态测量瘤块体积。肿瘤体积计算公式：V=0.5×L×D2（其中，V 为肿瘤体积，L 为肿瘤长径，D 为肿瘤短径）

3、对 4T1 原位乳腺癌生长和自发转移的影响

3.1 组别设置及给药方案

①PBS 组，种瘤后数天，PBS 滴鼻给药，100 μL/只，间隔 1 天给药 1 次；

②PD1 组：种瘤后数天，PD1 腹腔给药，100 μg/只，1 周给药 1 次；

③紫杉醇组，种瘤后数天，紫杉醇尾静脉注射给药，10 mg/kg，1 周 1 次；

④帕米卡滴鼻组，种瘤后数天，帕米卡滴鼻给药，100 μL(0.3 mg)/只，间隔 1 天给药 1 次，给药当天上午滴鼻 50 μL，下午滴鼻 50 μL；

⑤帕米卡肌注组，种瘤后数天，帕米卡肌注给药，100 μL(0.3 mg)/只，间隔 1 天给药 1 次；

⑥联合给药组，种瘤后数天，PD1 腹腔(100 μg/只，1 周给药 1 次)+帕米卡滴鼻(100 μL/只，间隔 1 天给药 1 次)；

⑦联合给药组，种瘤后数天，紫杉醇尾静脉注射(10 mg/kg，1 周给药 1 次)+帕米卡滴鼻(100 μL/只，间隔 1 天给药 1 次)。

3.2 每组动物数:每组 15 只（每组多余 5 只）。

3.3 结束实验时间点：根据实际情况（小鼠死亡或者给药组与对照组差异明显），可能提前结束实验。

3.4 实验方案

建立原位 4T1-luc 乳腺癌模型，以小动物活体成像仪进行早期检测分组，按照 6.1 项下组别设置和给药方案给药。检测肿瘤体积（3 天测 1 次）、体重变化（3 天测 1 次）、瘤重（终点检测）、脾重（终点检测）、TUNEL 染色（终点检测），肺脏用 Bouin’s 固定液固定后拍照，各组织器官中性甲醛固定后进行 H&E 染色（终点检测），并以小动物活体成像仪观察不同时间点和最终时间点原位肿瘤和转移部位的生物发光强度。综合比较各组之间的抑制原位肿瘤生长和转移的作用强弱。

实验证明，帕米卡在缩小乳腺癌肿瘤体积，控制瘤重、脾重，促进肿瘤细胞的凋亡等方面均具有明显效果。

最后应说明的是：以上各实施例仅用以说明本公开的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述各实施例对本公开进行了详细的说明，但本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本公开各实施例技术方案的范围。

工业实用性

本公开的复合物黏度和分子质量适中，制药方便，化学性质稳定，长期储存不易降解，使用安全，该化合物单独使用即可显著地增强机体非特异性的免疫反应，达到防治疾病的目的，与其他药物联合使用具有更好的抗肿瘤、抗病毒和抗（超级）细菌功效，易被患者所吸收。

权利要求书

1. 一种用于增强免疫响应的复合物的制备方法，包括：

将聚肌胞、至少一种阳离子稳定剂以及可溶性钙盐在液体反应体系中接触；

所述阳离子稳定剂为分子量≤5kDa 的水溶性非抗生素氨基化合物，或所述水溶性非抗生素氨基化合物与聚乙二醇单甲醚、聚乙二醇、聚乙烯亚胺、叶酸、半乳糖中的一种或多种所形成的接枝物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述水溶性非抗生素氨基化合物选自壳寡糖、几丁寡糖、氨基葡萄糖、阳离子脂质体、DEAE-葡聚糖、聚丙烯酰胺、聚胺、四氨富烯、聚乙烯亚胺中的一种或多种。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述阳离子稳定剂选自壳寡糖、壳寡糖与聚乙二醇单甲醚的接枝物、壳寡糖与聚乙二醇单甲醚和聚乙烯亚胺的接枝物。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其中所述接枝物的分子量≤50kDa。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的方法，其中，在所述液体反应体系中，所述聚肌胞的浓度为 0.1~10mg/ml；

可选的，在所述液体反应体系中，所述聚肌胞的浓度为 0.5~5mg/ml。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法，其中，在所述液体反应体系中，所述阳离子稳定剂的浓度为 0.5~51.2mg/ml；

可选的，在所述液体反应体系中，所述阳离子稳定剂的浓度为 0.8~25.6mg/ml。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法，其中，在所述液体反应体系中，所述可溶性钙盐中钙离子的浓度为 0.1~1mM。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的方法，其中，所述壳寡糖脱乙酰度大于等于 70%。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的方法，其中，所述可溶性钙盐选自 $CaCl_2$ 和/或 $CaNO_3$。

10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的方法，其中，所述聚肌胞由聚胞苷酸和聚肌苷酸经碱基配对反应制得。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中，所述聚胞苷酸、聚肌苷酸分子量大于 2.3 万道尔顿；

可选的，所述聚胞苷酸的分子量范围是在 6.6 万道尔顿~66 万道尔顿；

可选的，所述聚肌苷酸的分子量范围是在 6.6 万道尔顿~66 万道尔顿。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的方法，其中，所述碱基配对反应在 40℃~50℃的温度下进行。

13. 根据权利要求 10-12 中任一项所述的方法，其中，所述碱基配对反应在 pH=6.8~7.6 下进行。

14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的方法，其中，在进行接触反应之前，将所述聚肌胞 80℃~99℃下加热 70~120min；

可选的，在进行接触反应之前，所述聚肌胞 88℃~92℃下加热 70~120min。

15. 根据权利要求 1-14 中任一项所述的方法，其中，所述液体反应体系的温度为 40℃~50℃。

16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的方法，其中，所述接枝物的制备方法包括：

先用羰基二咪唑活化聚乙二醇单甲醚、聚乙二醇、聚乙烯亚胺、叶酸、半乳糖中的一种或多种，再用活化好的产物与所述水溶性非抗生素氨基化合物在离子液体[bmim]Cl 中进行接枝反应；

可选的，所述接枝物为壳寡糖与聚乙二醇单甲醚的接枝物，先用羰基二咪唑（CDI）活化聚乙二醇单甲醚（MPEG），再用活化好的 MPEG 与壳寡糖（COS）在离子液体[bmim]Cl 中进行接枝反应；

可选的，所述接枝反应在 60℃~80℃、非氧化气氛下反应。

17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的方法，其中，所述方法还包括：

将交联剂溶液在搅拌条件下逐滴加入制得的复合物中直至观察到反应体系中出现丁达尔现象后停止滴加，搅拌得到纳米粒子；

所述交联剂选自三聚磷酸钠、海藻酸钠、苯基硼酸、苯邻二酚中的至少一种；

可选的，所述交联剂溶液中还含有免疫细胞治疗药物、抗体治疗药物、化学药物、促进粘膜免疫吸收或粘膜粘附的物质、免疫调节剂、抗原、膜式识别受体的配体、药物可接受的盐或赋形剂中的一种或多种；

可选的，所述方法还包括，将所述复合物或所述纳米粒子与免疫细胞治疗药物、抗体治疗药物、化学药物、促进粘膜免疫吸收或粘膜粘附的物质、免疫调节剂、抗原、膜式识别受体的配体、药物可接受的盐或赋形剂中的一种或多种共孵育；

可选的，所述抗原均为蛋白质或多肽抗原；

可选的，所述抗原均包括肿瘤、病毒、细菌、真菌或寄生虫抗原；

可选的，所述肿瘤包括：骨、骨连接、肌肉、肺、气管、咽、鼻、心脏、脾脏、动脉、静脉、血液、毛细血管、淋巴结、淋巴管、淋巴液、口腔、咽、食管、胃、十二指肠、小肠、结肠、直肠、肛门、阑尾、肝、胆、胰腺、腮腺、舌下腺、泌尿肾、输尿管、膀胱、尿道、卵巢、输卵管、子宫、阴道、外阴部、阴囊、睾丸、输精管、阴茎、眼、耳、鼻、舌、皮肤、脑、脑干、延髓、脊髓、脑脊液、神经、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、垂体、松果体、胰岛、胸腺、性腺、舌下腺、腮腺中任一处病变生成的肿瘤；

可选的，所述细菌包括：葡萄球菌属、链球菌属、李式杆菌属、丹毒丝菌属、肾杆菌属、芽孢杆菌属、梭菌属、分支杆菌属、放线菌属、奴卡菌属、棒状杆菌属、红球菌属、炭疽杆菌、丹毒杆菌、破伤风杆菌、李氏杆菌、产气荚莫杆菌、气肿疽杆菌结核杆菌、大肠杆菌外、变形杆菌、痢疾杆菌、肺炎杆菌、布氏杆菌、产气夹膜杆菌、流感嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌、卡他摩拉克氏菌、不动杆菌属、耶尔森菌属、嗜肺军团菌、百日咳杆菌、副百日咳杆菌、志贺菌属、巴斯德菌属、霍乱弧菌、副溶血性杆菌中的一种或多种；

可选的，所述寄生虫包括：消化道内寄生虫、腔道内寄生虫、肝内寄生虫、肺内寄生虫、脑组织寄生虫、血管内寄生虫、淋巴管内寄生虫、肌肉组织寄生虫、细胞内寄生虫、骨组织寄生虫、眼内寄生虫中的一种或多种；

可选的，所述病毒包括：腺病毒(adeniviridae)、沙粒病毒(arenaviridae)、星状病毒(astroviridae)、本扬病毒(bunyaviridae)、杯状病毒(cliciviridae)、黄病毒(flaviviridae)、D 型肝炎病毒(hepatitis delta virus)、肝炎病毒(hepeviridae)、单分子负链 RNA 病毒(mononegavirales)、巢病毒(nidovirales)、小 RNA 病毒(聚胞苷酸 conaviridae)、正黏液病毒(orthomyxoviridae)、乳头瘤病毒(pa 聚胞苷酸 llomaviridae)、细小病毒(parvoviridae)、多瘤病毒(polyomaviridae)、痘病毒(poxviridae)、呼肠孤病毒(reoviridae)、反转录病毒(retroviridae)或披膜病毒(togaviridae)中的一种或多种；

可选的，所述真菌包括：粗球孢子菌、普赛德斯球抱子菌、荚膜组织胞浆菌、杜氏组织胞浆菌、洛博芽生菌、巴西副球孢子菌、皮炎芽生菌、申克氏孢子丝菌、马尔尼菲青霉菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、葡萄牙假丝酵母、卡氏肺孢子虫病、曲霉菌、甄氏外瓶霉、裴氏着色霉、紧密着色霉、疣状着色霉、皮炎着色霉、白地霉、波氏足肿菌、新型隐球菌、丝孢酵母菌、米根霉、印度毛霉、伞枝犁头霉、总状共头霉、蛙粪霉、冠状耳霉、异孢耳霉、比氏肠胞微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、西伯鼻孢子菌、透明丝孢霉、暗色丝孢霉中的一种或多种；

可选的，所述免疫细胞治疗药物选自肿瘤浸润淋巴细胞、树突状细胞、细胞因子诱导杀伤细胞、树突细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞、自然杀伤细胞、γδT 细胞、CD3AK、CAR-T 和 TCR-T 中的一种或多种；

可选的，所述抗体治疗药物选自抗 PD1 抗体、抗 PDL1 抗体、抗 CTLA4 抗体和抗 CD 抗原抗体；

可选的，所述化学药物选自烷化剂、抗代谢药、抗肿瘤抗生素、植物类抗肿瘤药、激素类药物和杂类药物中的一种或多种；

其中所述杂类药物选自左旋门冬酰胺酶、顺铂、卡铂、草酸铂、氮烯咪胺、六甲嘧胺类药物，或上述药物的衍生物；

可选的，所述促进粘膜免疫吸收或粘膜粘附的物质选自阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、非离子表面活性剂、特种表面活性剂、螯合剂、粘合剂、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、右旋糖酐、多聚糖中的一种或多种；

可选的，所述免疫调节剂选自细胞因子、趋化因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、造血因子、集落刺激因子(CSF)、干扰素、促红细胞生成素、促血小板生成素、肿瘤坏死因子 (TNF)、白介素(IL)、粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)和干细胞生长因子中的一种或多种；

可选的，所述膜式识别受体的配体选自 TLR 受体的配体、RLR 受体的配体、CLR 受体的配体、NLR 受体的配体。

18. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法制备的用于增强免疫响应的复合物。

19. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法制备的用于增强免疫响应的复合物，用于制备抗体、疫苗制剂或疫苗组合物，增强免疫细胞活性，治疗和/预防肿瘤、抗病毒、抗细菌、抗真菌、抗寄生虫、降低化疗副作用、抗疲劳或提升免疫力、缓解宿主疼痛、促进宿主对于抗原的免疫反应中的应用。

20. 一种用以促进宿主体内对于抗原的免疫反应，或调节增强宿主免疫细胞活性，或帮助宿主降低

疲劳度，或减轻宿主疼痛的方法，所述方法包括将根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法制备的用于增强免疫响应的复合物，或包括根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法制备的用于增强免疫响应的复合物以及至少一种抗原的疫苗组合物，或包括根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法制备的用于增强免疫响应的复合物的药物组合物给予该宿主，

其中所述药物组合物还包括免疫细胞治疗药物、抗体治疗药物、化学药物、促进粘膜免疫吸收或粘膜粘附的物质、免疫调节剂、病原体抗原、膜式识别受体的配体、药物可接受的赋形剂中的一种或多种。